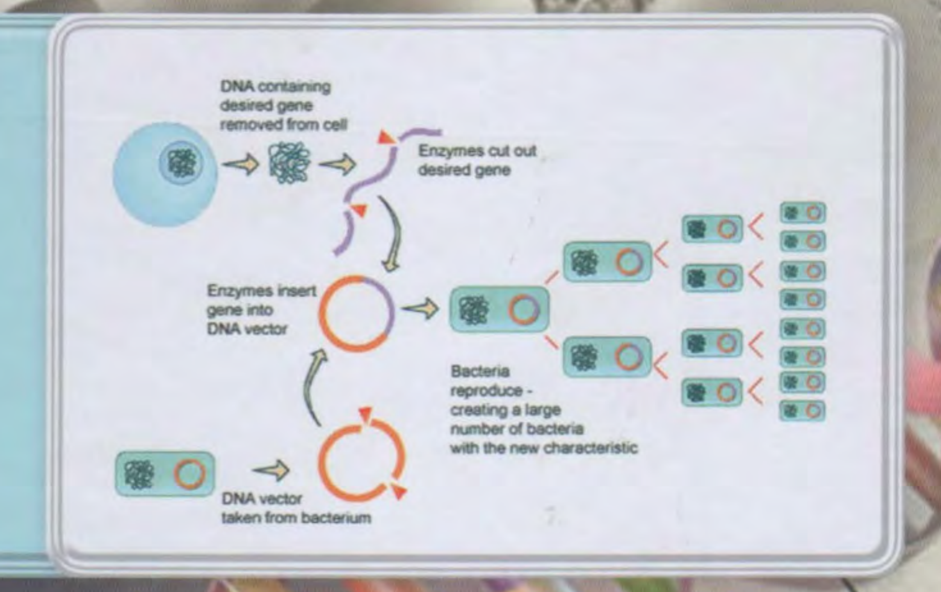
مدخل الى
تطبيقات الهندسة الوراثية
في الطب العدلي

الأستاذ الدكتور
علي حمود السعدي



DNA Strand



www.darsafa.net

مؤسسة دار الصادق الثقافية
طبع . نشر . توزيع

بسم الله الرحمن الرحيم

﴿ وَقُلِ اعْمَلُوا فَسَيَرَى اللَّهُ عَمَلَكُمْ وَرَسُولُهُ وَالْمُؤْمِنُونَ ﴾

مدخل الى تطبيقات الهندسة الوراثية

في الطب العدلي

مدخل إلى تطبيقات الهندسة الوراثية

في الطب العدلي

الأستاذ الدكتور

علي حمود السعدي

أستاذ الهندسة الوراثية والوراثة البشرية

كلية العلوم – جامعة بابل

الطبعة الأولى

2011 م – 1432 هـ



مؤسسة دار الصادق الثقافية

طبع، نشر، توزيع



دار صفاء للنشر والتوزيع – عمان

المملكة الأردنية الهاشمية
رقم الإيداع لدى دائرة المكتبة الوطنية (3016/ 8/ 2010)

660.65
السعدي، علي حمود
مدخل إلى تطبيقات الهندسة الوراثية في الطب العدلي/ علي حمود السعدي.- عمان: دار صفاء للنشر والتوزيع 2010.
( ) ص
ر. أ: 3016/ 8/ 2010
الواصفات: الهندسة الوراثية// علم الوراثة

* - تم اعداد بيانات الفهرسة الأولية من قبل دائرة المكتبة الوطنية

الطبعة الأولى
2011م – 1432هـ

دار صفاء للنشر والتوزيع
عمان - شارع الملك حسين - مجمع الفحيص التجاري
تلفاكس 4612190 6 962+ هاتف: 4611169 6 962+
ص. ب 922762 عمان – 11192 الاردن
DAR SAFA Publishing - Distributing
Telefax: + 962 6 4612190 Tel: + 962 6 4611169
P.O.Box: 922762 Amman 11192 - Jordan
http://www.darsafa.net
E-mail :safa@darsafa.net

مؤسسة دار الصادق الثقافية
طبع، نشر، توزيع
العراق – بابل – الحلة
الفرع الاول، الحلة - شارع ابو القاسم - مجمع الزهور.
نقال : 009647801233129
الفرع الثاني: الحلة - شارع ابو القاسم، مقابل مسجد ابن نما.
نقال : 009647803087758
E - Mail :alssadiq@yahoo.com

ISBN 978-9957-24-679 -2 ردمك

وَتَــــزعُمُ أَنَّـــكَ جُـــرْمٌ صَـــغِيرٌ

وَفِيـــكَ انْطَـــوَى العَـــالَمُ الأَكْـــبَرُ

الإمام علي بن أبي طالب

الإهداء

في غربتي كنت...

أتذكر بصبرك العراق يا أبي

وأرى بوجهك سلوتي يا أمي

وأتأمل جمال عشتار وأُسرتي

وأثق بخير دجلة والفرات يا معلمي

الفهرس

الفصل الثاني

كيمياء وتنظيم الأحماض النووية والتعبير الجيني

الفصل الثالث

مستويات تنظيم الـDNA في الكروموسوم

الفصل الرابع

تداول الأحماض النووية

الفصل الخامس

إنزيمات التداول مع الـDNA

الفصل السادس

لمحة عن بعض خطط الاستنسال الكلونة Cloning

الفصل السابع

تباين الـDNA وأنواع المجسات المستعملة في العلوم الجنائية

الفصل الثامن

مصادر الـDNA وإجراء البصمة الجينية

الفصل التاسع

تطبيقات وأبعاد البصمة الجينية

الفصل الحادي عشر

دراسة مسرح الجريمة

تقديم

بِسْمِ اللَّهِ الرَّحْمَنِ الرَّحِيمِ

﴿ وَفِي الْأَرْضِ آيَاتٌ لِّلْمُوقِنِينَ (٢٠) وَفِي أَنفُسِكُمْ ۚ أَفَلَا تُبْصِرُونَ (٢١) ﴾

الذاريات: 20 – 21

مثلٌ من آيات الرحمن تبارك عزّ وجل، لتكشف البحوث يوماً بعد يوم عن دقّة الخالق وحكمته، إذ اتّجهت الكثير من بحوث الهندسة الوراثية إلى إيجاد طرق ملائمة وكفوءة نحو تحديد بصمة الـــDNA (DNA fingerprint) لتشخيص الهوية البيولوجية كإرهاصات خاصة بكل فرد، لاسيما وأن الطرق التقليدية لم تمتلك الكفاءة والمرونة اللازمة لتحقيق هذا الغرض، نعم إنها هدية الله للعلم الجنائي.

فما أن أُنزل آدم عليه السلام إلى الأرض، حتى حدثت أول جريمة قتل بين اثنين من أبنائه، عندما قتل قابيل أخيه هابيل ﴿ فَطَوَّعَتْ لَهُ نَفْسُهُ قَتْلَ أَخِيهِ فَقَتَلَهُ فَأَصْبَحَ مِنَ الْخَاسِرِينَ ﴾[المائدة 30]. ومن حينها لم تنقطع الجريمة وظلّت تُشكّل همّاً من هموم البشرية إلى يومنا هذا، لذا وقف الإنسان أمام تلك التحديات التي تستهدف أمانه وحياته، وراح يُفتّش عن كل الوسائل والمستلزمات المساعدة في حل ألغاز الجريمة، وسن القوانين والتشريعات لنشر الطمأنينة، وردع كل من تسوّل له نفسه في القتل والإيذاء.

ومع زيادة أعداد السكان وتعقيدات الحياة وتطوّر البشرية ازدادت معدلات الجريمة وتطوّرت أساليب تنفيذها، كما ارتقت فنون وألاعيب الإخفاء والمراوغة للإفلات من دلائل الكشف عنها، ورافق ذلك تقدّم متوازٍ في تطوّر التقنيات العلمية للإمساك بكل خيط يساعد القاضي في إصدار حكم عادل، الأمر الذي يتطلّب العون لأكثر من شخص أو تخصص، وقد كانت الهندسة الوراثية الفجر الواعد الذي يُبشّر في حل أعقد الألغاز في مجال الجريمة.

كنتُ أُكلّمُ نفسي ذات يوم، لماذا لا أُقدّم بطاقة مُعايدة إلى أحبّتي عندما توقّفتُ عند كلماتٍ للشاعر سميح القاسم في قصيدة «بطاقات مُعايدة إلى الجهات الست»، تقول: أُسوةً بالمساجين ضنّاً على ذمّة البحثِ عن تُهمةٍ لائقة...... .

إن تحمسي لتأليف كتاب (مدخل إلى تطبيقات الهندسة الوراثية في الطب العدلي) يعود إلى اعتقادي بأهمية توفر مثل هذا المصدر في المكتبة العربية، فضلاً عن كون هذا المجال لم يلقَ بعد نصيبه من الاهتمام بالنسبة للبرامج الدراسية في المؤسسات الأكاديمية العربية، على الرغم من أن تطبيقاته تُعدّ في غاية الأهمية، إذ يمكن أن يفيد طلبة كليات الطب والقانون والشرطة، وأقسام التقنيات الحيوية وعلوم الحياة في كليات العلوم وكليات ومراكز أخرى، كما أنه يوفّر مجالاً علمياً خصباً للأطباء الممارسين وطلبة الدراسات العليا المتخصصين في الطب العدلي.

يصف هذا الكتاب أساسيات الأحياء الجزيئي وتقنيات الهندسة الوراثية بشيء من التركيز والتوضيح، بعيداً عن الاختصار المُخل والإسهاب المُمل، بالإضافة إلى المحاور الأساسية المتعلّقة بتطويع تلك التقنيات في مجال العلوم العدلية (الشرعية)، من خلال استعراض مُبسّط لها لسهولة إيصالها للقارئ الكريم، إذ حاولت استعمال أكثر التعبيرات والمصطلحات والألفاظ العلمية شيوعاً في العالم العربي، وخصوصاً تلك المُتفق عليها، وعملت على ذكر المرادفات والمصطلحات المفهومة قدر الإمكان، والتي لا يوجد اتفاق عليها .

يقع الكتاب أحد عشر فصلاً، تناولت العشرة فصول الأولى منها تقنيات وتطبيقات الهندسة الوراثية في علم الطب العدلي، في حين تناول الفصل الحادي عشر دراسة موضوع مسرح الجريمة بأسلوب ملخص من أجل الفائدة العامة.

وهنا أجد لزاماً عليَّ أن أتقدم بالشكر والعرفان إلى كل من مدّ يد العون والمساعدة، وأخص بالذكر أستاذي الفاضل أ. د. نصر فرحان عبد الله، الذي تعلّمت على يده روح البحث العلمي، ولا يفوتني عرفاناً ووفاءً شكر أساتذتي:

أ. د. علي عبد الرحمن الزعاك، و أ. د. علاء يحيى الباقر، و أ. د. المرحوم فاروق يس العاني، الذين كان لهم الأثر الكبير في مسيرتي العلمية. كما أشكر أيضاً الأخ د. سعد

حمود السعدي، والزميلين العزيزين د. فهيم عبد الكريم بن خيال، و د. حيدر كامل السعدي على المساعدة المعنوية الخالصة، مع تقديري وامتناني لكل من الدكتور عبد السلام موسى بو الحاج وعلي أبو بكر المسماري على المساعدة العلمية القيّمة. وأود أن أعبّر عن خالص شكري وتقديري للأخ أ. د. نبيل هاشم الأعرجي، رئيس جامعة بابل للمساندة المعنوية اللامحدودة.

وأجد من الإحسان أن أضع قبلةً على أكف والديَّ علّها تُعبّر عن مثقال ذرّة خير لينبوع عطائهما الذي لا ينضب.

ومودّةً أتقدّمُ بالشكر والمحبّة إلى أسرتي: زوجتي العزيزة الدكتورة عشتار منعم المحنا، وأبنائي الحسن وزين العابدين، وبناتي زينب وزهراء، للدعم المعنوي وتهيئة الأجواء الهادئة التي كانت على حساب الوقت الذي يعيشه الأب لعائلته.

هذا ولا يفوتني أن أتقدّم بالامتنان للأخ أحمد عبد العالي الكعبي الذي كان له فضلاً كبيراً في طباعة وإخراج هذا الكتاب.

كما أتوجّه إلى القارئ الكريم بالتماس العذر والعفو، إذ لا أُنزّه نفسي من الخطأ أو السهو... راجياً أن أكون قد وُفّقت في تقديم هذا الجهد المتواضع بالقدر المعقول ...

بِسْمِ ٱللَّهِ ٱلرَّحْمَٰنِ ٱلرَّحِيمِ

﴿ لَا يُكَلِّفُ ٱللَّهُ نَفْسًا إِلَّا وُسْعَهَا ۚ لَهَا مَا كَسَبَتْ وَعَلَيْهَا مَا ٱكْتَسَبَتْ ۗ رَبَّنَا لَا تُؤَاخِذْنَآ إِن نَّسِينَآ أَوْ أَخْطَأْنَا ۚ رَبَّنَا وَلَا تَحْمِلْ عَلَيْنَآ إِصْرًا كَمَا حَمَلْتَهُۥ عَلَى ٱلَّذِينَ مِن قَبْلِنَا ۚ رَبَّنَا وَلَا تُحَمِّلْنَا مَا لَا طَاقَةَ لَنَا بِهِۦ ۖ وَٱعْفُ عَنَّا وَٱغْفِرْ لَنَا وَٱرْحَمْنَآ ۚ أَنتَ مَوْلَىٰنَا فَٱنصُرْنَا عَلَى ٱلْقَوْمِ ٱلْكَٰفِرِينَ ﴾

البقرة : 286

أ. د. علي حمود محيسن السعدي

2010

الفصل الاول

المقدمة

1

الفصل الأول

المقدمة

لعلّ هذا التلازم التاريخي الوثيق بين التقنيات العلمية وتطبيقاتها، هو أهم نتاج للإرث الحضاري الذي أفاد البشرية، وقدّم لها شتّى الخدمات دقّةً وسرعةً، وقد كان علم الطب العدلي (Forensic medicine) أو ما يُسمّى بالعلم الشرعي أو الجنائي (Forensic science)، واحداً من اختصاصات علمية مختلفة، محوراً مهماً لتلك التطبيقات.

لقد استُعملت تقنيات الهندسة الوراثية، وخصوصاً في العشرين سنة الأخيرة من الحقبة الحالية بشكل واسع، كأداة مهمّة في تقديم أدلّة علمية دقيقة في الطب العدلي، مُتضمّنةً التعرّف على الشخص القاتل، وتشخيص الأب الحقيقي للطفل موضع الشك (الذي مارست أمّه الجماع مع أكثر من رجل)، وتحديد صلة القرابة وشرعيّة الأبوّة والأمومة للأطفال (الناتجة عن التبديل المقصود أو غير المقصود للأطفال حديثي الولادة في صالات الولادة وأماكن أخرى)، وتحديد هوية الجثث المُعرّضة للتلف في حالات التنقّل أو الإجرام. فعلى سبيل المثال لا الحصر، تُقدّم البصمة الجينية (بصمة الـDNA، DNA fingerprint)، في حالات الشك الأبوي، دليلاً قوياً على العلاقات الوراثية العائلية، فشكل الحُزم (Bands) للفرد هي في الواقع جين ناتج عن كروموسومات الأب والأم، لذلك فإن بصمة DNA الطفل ستحتوي على حُزم تتشابه مع بعض الحُزم في بصمة الـDNA لكل من الأب والأم.

سهّلت بصمة الـDNA المُتحصّل عليها بالاعتماد على بقايا الخلايا والأنسجة المُتاحة في مسرح الجريمة (Crime scene)، مثل بُقع الدم أو النُطف (المأخوذة من الضحية المُغتصبة)، أو بُصيلات الشعر، أو الخلايا العالقة في أظافر الضحية، أو اللُعاب، أو الإفرازات المهبلية.. الخ، كثيراً من مهمّة رجال القضاء والأمن في حل عدد

من المشاكل القانونية المُستعصية، إذ تُعدّ تقنية التباين في أطوال قطع التقييد RFLPs (Restriction fragment length polymorphisms)، وبمساعدة تقنية الـPCR (Polymerase chain reaction)، وتقنيات مُكمّلة أخرى المحور العملي الأساسي لبصمة الـDNA.

إن جوهر التباين في هذه البصمة يعتمد على التغايرات الموجودة في أعداد المتكررات المترادفة VNTRs التي تختلف من شخصٍ لآخر، بحيث تعتمد تلك الاختلافات بشكل أساسي على التغايرات الموجودة في جينوم الإنسان أو ما يُسمّى بالتوابع الكروموسومية الصغيرة (Minisatellites) والتوابع الكروموسومية الدقيقة (Microsatellites).

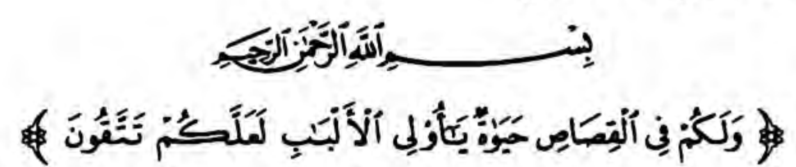
وطالما أن كل فرد يتمتع بـDNA ثابت ومُتفرّد، فإن إجراء بصمة الـDNA يُستخدم بصورة مُقنعة وكفوءة للتعرّف على هوية شخص ما في هذه المعمورة. وعليه يمكن القول بأن بصمة الـDNA هي نمط مُتفرّد، لا يتشابه فيها اثنان إلاّ التوائم الصنوية، الأمر الذي جعل منها قرينة من قرائن النفي والإثبات الغير قابلة للتشكيك، والتي يُعتدّ فيها في غالبية المحاكم المدنية والجنائية في أوروبا وأمريكا ودول العالم المتقدّم، في كثير من الجرائم المُعقّدة، كما أن عمليات تغيير معالم الوجه جراحياً، والتي نتوقّع أن يلجأ إليها بعض المجرمين والمطلوبين للعدالة، وخصوصاً الشخصيات الإرهابية الخطيرة، في سبيل عدم التعرّف والوصول إليهم، تُشكّل هي الأخرى تحدياً سهلاً أمام فعالية بصمة الـDNA، وهي بهذا فتحت باباً واسعاً من المرونة والدقّة في توفير الدليل القاطع والمانع لعمليات التضليل والتزوير للحقائق والأدلّة.

هذا وعلى الرغم من الحداثة النسبية لتقنيات الهندسة الوراثية بشكلٍ عام، وتطبيقاتها الجنائية بشكلٍ خاص، إلاّ أن التطورات السريعة والمُتلاحقة في هذه التقنيات، فضلاً عن التحسينات التي أُدخلت عليها، قد أدّت إلى تأكيد الثقة بتلك التطبيقات، ممّا زاد من أهميّتها في مجال الكشف عن أسرار الجرائم، بحيث تنخفض نسبة التشابه بين أي شخصين إلى $1/10^5$، وتصل إلى $1/10^8$، مع العلم أننا نحتاج إلى كمية معقولة من الـDNA تتراوح بين 15 - مايكروغرام.

وإذا قلنا تقريباً أن فرصة تطابق فردين في بصمة الـDNA غير ذي علاقة، هي 1 في المليون بليون، فإنها حتى في الأشخاص الأخوة (عدا التوائم الصنوية) هي 1 في كل 10000 مليون.

حقاً إن اختراع البصمة الوراثية كان من الإنجازات العلمية العظيمة في مجال القانون منذ استخدام بصمات الأصابع، وهي بالفعل نعمة وفضل من الله عزّ وجل، بوصفها وسيلة فعّالة في إحقاق الحق وإزهاق الباطل، وفي توفير الأمان والشعور بالثقة للبشر الذين يوضعون في الزنزانات، دون ذنبٍ سوى الشّك بأنهم مجرمين.

قال تعالى في كتابه الحكيم :



البقرة : 179

الفصل الثاني

دراسات في الحوكمة المؤسسية
والأداء المالي الاستراتيجي



الفصل الثاني

كيمياء وتنظيم الأحماض النووية والتعبير الجيني

يتضمّن هذا الفصل معلومات عامة أساسية، ولكن من المُمكن التطرّق إلى بعض التفاصيل المُتعلّقة بها في فصول لاحقة.

انواع الخلايا Types of the cells:

أ. بدائيات النواة Prokaryotes:

لا تحتوي هذه الخلايا على عُضيّات مُحاطة بأغشية داخلية، فعلى سبيل المثال، لا يوجد غلاف نووي (Nuclear membrane) يُحيط بالمادة النووية والكروموسوم الذي يقع في جانب واحد من الخلية، ويلامس غشاء الخلية. كذلك لا توجد مايتوكوندريا، ولذلك لا يوجد انقسام ميتوزي (Mitosis) في وضعيّته التقليدية، إذ تتمثّل خلايا بدائيات النواة بالبكتريا والطحالب الخضراء المزرقّة (Blue-green algae). ومن الجدير بالذكر، أن هذه الخلايا قد تحتوي على DNA كروموسومي إضافي (Extra-chromosomal DNA) بهيئة DNA حلقي مزدوج الشريط يدعى بالبلازميدات، والتي تحمل جينات مهمّة، مثل جينات المقاومة للعقاقير.

ب. حقيقيات النواة Eukaryotes:

تحتوي هذه الخلايا على عُضيّات محاطة بأغشية داخلية، مثل المايتوكوندريا، والأجسام الحالّة (Lysosomes)، والنواة المُحاطة بالغلاف النووي الذي يُحيط بالكروماتين النووي، كما هو الحال في خلايا الخمائر والفطريات والنباتات واللافقريات (Invertebrates) والحيوانات. هذا ويوجد أيضاً DNA خارج نووي بهيأة جزيئات من أشرطة مزدوجة حلقية في المايتوكوندريا أو البلاستيدات (أو ما يُسمّى بجينوم المايتوكوندريا أو جينوم البلاستيدة).

إن المعلومات المتعلّقة بتصنيع البروتين مخزونة في الجينوم (Genome) أو الجهاز الوراثي للخلية (DNA)، الذي ينتقل من الخلية إلى خلايا الأجيال التالية. كما أن الخلايا المُتخصصة مثل الخلايا الكبدية (Hepatocyte) والعصبية (Neuron) والبنكرياسية (Pancreatic cell) تختلف في طبيعة البروتين المُصنّع في كل منها، مع العلم أن هذه البروتينات تكون نفسها لكل نوع خلال الأجيال، ولكن تختلف بشكل واضح بين هذه الأنواع، أي التمايز الخلوي (Cellular differentiation) الناتج عن اختلاف التعبير الجيني للجينات.

الأحماض النووية Nucleic acids:

وهي خزين المعلومات الوراثية المُشفّرة لتصنيع البروتينات، وحامل للمواد المُنظّمة والمسيطرة على هذه العمليات. ومن جانبٍ آخر، تُعبّر البروتينات عن الصفات الوراثية، ولهذا فإن الـDNA يُنجز السيطرة الوراثية والهوية الذاتية من خلال البروتينات. ولكي يتم تصنيع البروتين في السايتوبلازم، فإنه لا بُدّ من تصنيع نسخة رسولية كجزء من الـDNA المطلوب لنقل السايتوبلازم، للسيطرة على، وتوجيه عملية تصنيع البروتين (mRNA).

تركيب الـDNA Structure of deoxyribonucleic acid (DNA):

وهو عبارة عن جزيئات ذات وزن جزيئي عالي، يتكوّن من آلاف الوحدات البنائية، تُسمّى نيوكليوتيدات (Nucleotides). وكل نيوكليوتيدة مُكوّنة من قاعدة نيتروجينية (Nitrogenous base)، وسكر خماسي (Pentose sugar)، وجزيئة حامض الفسفوريك (Phosphoric acid molecule).

القواعد النيتروجينية: وهي القواعد البيورينية (Purine bases)، التي تشمل الأدنين A (Adenine) والجوانين G (Guanine) والقواعد البايرميدينية (Pyrimidine bases)، التي تشمل السايتوسين C (Cytosine) واليوراسيل U (Uracil، موجود في RNA فقط) والثايمين T (Thymine، موجود في DNA فقط).

السكر الخماسي : وهو سكر الرايبوز (Ribose) في الـRNA، وسكر الرايبوز منقوص الأوكسجين (Deoxyribose) في الـDNA. والشكل (2 – 1) يوضّح جزء من شريط DNA مُكوّن من جوانين، أدنين، سايتوسين، ثايمين. ويُبيّن الآصرة الفوسفاتية ثنائية الأستر (Phosphodiester bond) في عموده الفقري.

إن القواعد النيتروجينية ترتبط مع ذرة الكربون رقم 1 (C1) للسكر الخماسي، ويرتبط حامض الفسفوريك مع ذرة الكربون رقم 5 (C5) لهذا السكر، (شكل 2 – 1).

شكل (2 – 1). ارتباط النيوكليوتيدات مع بعضها ضمن شريط الـDNA

ترتبط النيوكليوتيدات فيما بينها بواسطة الآصرة الفوسفاتية ثنائية الأستر، ولذلك فإن مجموعة الهيدروكسيل (OH) على ذرة الكاربون 3 (C3) للسكر الخماسي في النيوكليوتيدة ترتبط مع مجموعة الهيدروكسيل على حامض الفسفوريك المُرتبط مع ذرة الكاربون 5 (C5) للسكر الخماسي للنيوكليوتيدة التالية. ولذلك فإن شريط الـDNA أو

الـRNA سوف يمتلك مجموعة فوسفات حرة عند مجموعة الهيدروكسيل لذرة الكاربون رقم 5 للسكر الخماسي، أو عند نيوكليوتيدة نهايته القمّية (Top end) (النهاية الطرفية اليسرى Left terminal)، أي بمعنى 5′-end. ومجموعة هيدروكسيل حرة في ذرة الكربون C3 للسكر الخماسي عند نيوكليوتيدة نهايته القاعدية (Bottom)(النهاية الطرفية اليمنى Right terminal)، أي بمعنى 3′-end. ولهذا فإن الحامض النووي يمتلك قطبية 3′-5′. والتسلسل المُشفّر للنيوكليوتيدة يُقرأ بالاتجاه من 5′ إلى 3′ في الـmRNA، والاتجاه 3′ إلى 5′ في الـDNA.

بعض قياسات الـDNA وأوزانه:

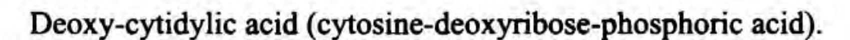
- وزن الزوج القاعدي AT = 617 دالتون.
- وزن الزوج القاعدي GC = 618 دالتون.
- وزن كيلو زوج قاعدي (1 kb) = 1000 bp = 617500 دالتون.
- 1 kb = 1.026 × 10^{-6} بيكوجرام (pg). أي أنه 1 pg = 10^{6} kb.
- المسافة بين زوجين قاعديين متتاليين = 3.4 A^{o} = 0.34 nm.
- 1 kb = 340 nm = 0.34 µm.
- 1 µm من DNA مزدوج الأشرطة = 2.9 kb.
- قطر حلزون الـDNA المزدوج = 20 A^{o}.

التركيب الأولي للـDNA Primary structure of DNA:

يتواجد الـDNA في النواة (Nucleus)، ويحتوي على السكر الخماسي منقوص الأوكسجين والأدنين والجوانين (قواعد بيورينية) والثايمين والسايتوسين (قواعد بايرميدينية)، إذ إن التركيب الأولي للـDNA يمثّل تسلسل خيطي (Linear sequence) من الوحدات النيوكليوتيدية البنائية بالشكل الآتي:

Deoxy-adenylic acid (adenine-deoxyribose-phosphoric acid).

Deoxy-guanylic acid (guanine-deoxyribose-phosphoric acid).

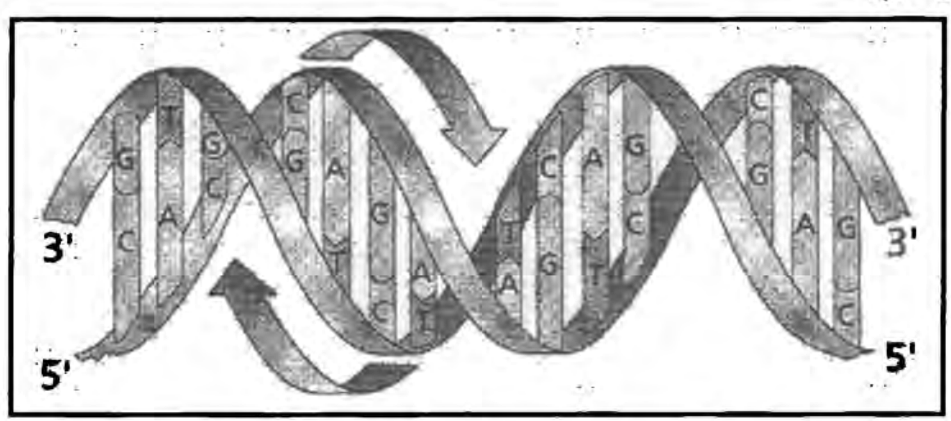

Deoxy-cytidylic acid (cytosine-deoxyribose-phosphoric acid).

Deoxy-thymidylic acid (thymine-deoxyribose-phosphoric acid).

التركيب الثانوي للـDNA   Secondary structure of DNA:

يتواجد الـDNA بهيئة جزيئة مزدوجة الشريط (Double stranded molecule)، ويتكوّن كل شريط من جزيئية طويلة جداً تحتوي على آلاف النيوكليوتيدات. إن كِلا الشريطين يكونان باتجاهين متوازيين متعاكسين (Anti-parallel)، أي أنه يكون اتجاه أحد الأشرطة ′5 ← ′3 (الشريط المُشفّر أو الحسّاس The coding or sense strand)، والشريط الآخر يكون باتجاه ′3 ← ′5 (الشريط غير الحساس أو غير المُشفّر أو القالب The antisense, non-coding or template strand). إن كِلا الشريطين يكملان بعضهما البعض اعتماداً على أساس التزاوج القاعدي الذي يُشير إلى أن الأدنين يرتبط مع الثايمين بواسطة آصرتين هيدروجينيتين، ويرتبط الجوانين مع السايتوسين دائماً بواسطة ثلاث أواصر هيدروجينية.

إن نسبة البيورينات (G+A) إلى البايرميدينات (C+T) تساوي تقريباً 1، (شكل 2 – 2).



شكل (2 – 2). الحلزون المزدوج الأشرطة للـDNA

تلتف جزيئة الـDNA ذات الأشرطة المزدوجة لتكوّن هيئة حلزونية حول محور طولي مشترك، وهذا الترتيب يؤدي إلى تكوين نوعين من الأخاديد، وهي الأخاديد

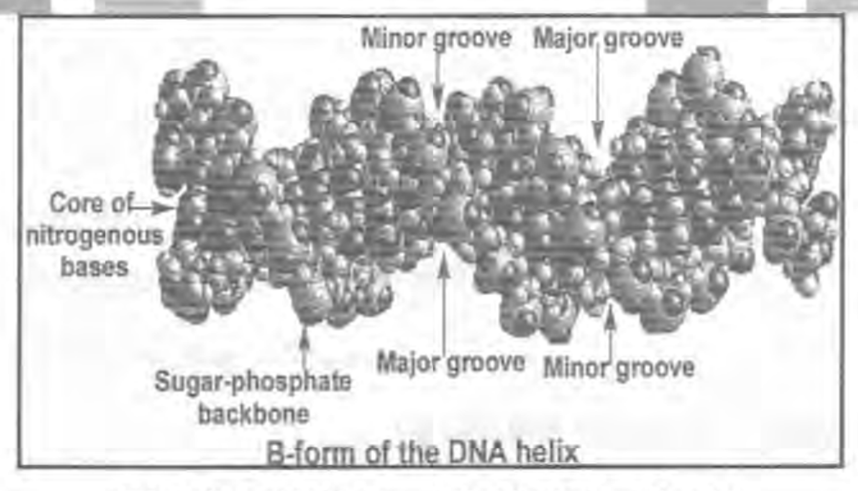
الكبرى والصغرى (The Major and the minor grooves)، وذلك لأن الفراغ الذي يُملأ بثنائيات الأدنين – ثايمين لا يُماثل ذلك الذي يُملأ بثنائيات الجوانين – سايتوسين، (شكل 2 – 3).

شكل (2 – 3). ارتباط القواعد النيتروجينية المتقابلة في شريطي الـDNA المتوازيين

في تركيب الـDNA، يبرز السكر الخماسي منقوص الأوكسجين المُحب للماء، وحامض الفسفوريك باتجاه الخارج لتكوين العمود الفقري للجزيئة، في حين تُرص القواعد النيتروجينية الكارهة للماء في مركز الجزيئة لكي تكون قادرة على التقابل مع القواعد النيتروجينية في الشريط الآخر، وتسهيل ارتباطها مع بعضها البعض بواسطة الأواصر الهيدروجينية.

وطبقاً إلى التركيب الحلزوني (الذي يعتمد على تركيب القواعد والظروف الفيزياوية) يكون الـDNA بثلاثة أنواع:

1. شكل B-form: وهو حلزون يميني الدوران (Right-handed helix) ويُعدّ الشكل الأكثر شيوعاً، (شكل 2 – 4).



شكل (2 – 4). الشكل B (B-form) لحلزون الـDNA

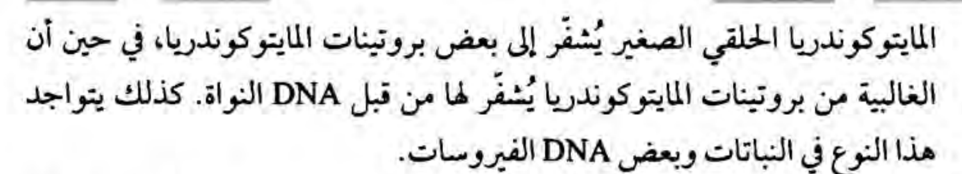
2. شكل A-form: وهو الشكل فاقد للماء من الشكل B تحت محتوى ملحي مُنخفض، وأقصر وأسمك مقارنةً بالشكل B، ويتملك ارتفاعاً قصيراً في لفّاته (لفّة: turn)، ولكنه لا يتواجد تحت الظروف الفسيولوجية.

3. شكل Z-form: وهو ذو شكل حلزوني زكزاكي يساري الدوران (Left-handed and zigzag-like helix)، وأنحف من الشكل B، الأمر الذي يؤدّي إلى اختفاء الأخاديد الكبرى، وزيادة عمق الأخاديد الصغرى. وهو يتكوّن من الشكل B تحت ظروف التركيز العالي للأيونات الموجبة، وكذلك في المناطق الغنية بالـG والـC.

طبقاً إلى عدد الأشرطة يكون الـDNA إما مُفرد أو مُزدوج الشريط (Single or double stranded)، وكل منهما قد يكون حلقي أو خيطي مفتوح (Circular or opened linear):

1. الـDNA الخيطي مزدوج الشريط (Double stranded linear DNA): يتواجد في النواة للخلايا الجسمية (Somatic cells)، ويُشفّر إلى أغلب البروتينات الخلوية. وكذلك يتواجد في DNA الفيروسات.

2. الـDNA الحلقي مزدوج الشريط (Double stranded circular DNA): يتواجد في المايتوكوندريا والمنطقة النووية للبكتريا والـDNA البلازميدي. إن DNA



المايتوكوندريا الحلقي الصغير يُشفّر إلى بعض بروتينات المايتوكوندريا، في حين أن الغالبية من بروتينات المايتوكوندريا يُشفّر لها من قبل DNA النواة. كذلك يتواجد هذا النوع في النباتات وبعض DNA الفيروسات.

3. الـDNA الحلقي مفرد الشريط (Single stranded circular DNA): يتواجد في بعض الفيروسات الملتهمة للبكتريا (Bacteriophages).

تركيب الأحماض النووية الرايبوزية

Structure of ribonucleic acid (RNAs)

يتواجد الـRNA بشكل رئيسي في السايتوبلازم، وهو عبارة عن بوليمر لشريط مفرد من النيوكليوتيدات الرايبوزية (Ribonucleotides) من الأدنين والجوانين والسايتوسين واليوراسيل (بدلاً من الثايمين). وهو يحتوي على الرايبوز بدلاً من الرايبوز منقوص الأوكسجين. إذ يتواجد في النواة (Nucleus) والنويّة (Nucleolus) والسايتوبلازم والمايتوكوندريا. وهو يكون بثلاثة أنواع، تختلف في المنشأ والوظيفة والحجم والتحوّر التركيبي وهي:

1. الـRNA الرسولي (mRNA) Messenger RNA:

إن النسخة الأولية الغير ناضجة من mRNA تدعى RNA النووي المُتباين hnRNA (Heterogenous nuclear RNA)، وبعد المعاملات، يكون على شكل جزيئة من شريط مفرد تتباين في الحجم من 400 – 4000 نيوكليوتيدة. وهو يتميّز في حقيقيات النواة (Eukaryotes) بحدوث تحويرات كثيرة بعد عملية الاستنساخ (Post-transcriptional modification). إذ إن أول هذه التحويرات هي إزالة التسلسلات الداخلية الغير قابلة للترجمة والغير وظيفية (Non-functional untranslatable internal sequences)، أي الانترونات (Introns). ثمّ يُضاف الذيل مُتعدّد الأدنين (polyadenylate tail) بحدود 250 – 20 قاعدة عند النهاية '3 (3'-end) الذي يعلم الـmRNA للاستنساخ في السايتوبلازم ويحميه أيضاً من التحلل بفعل إنزيم 3'-exonuclease كما وتضاف القلنسوة (7-methyl-guanosine triphosphate cap) عند النهاية '5 (5'-end) للـmRNA. إن هذه القلنسوة توجّه عملية بدء الترجمة، وتحمي الـmRNA من التحلل بفعل إنزيم 5'-exonuclease. كما

ويحتوي كذلك على مناطق لا تترجم عند الأطراف ′5 و′3 (5′ and 3′ terminal untranslated regions) تتضمّن تسلسل تنظيمي (Regulatory sequence) للترجمة وللعمر النصفي للـmRNA، (شكل 2 – 5).

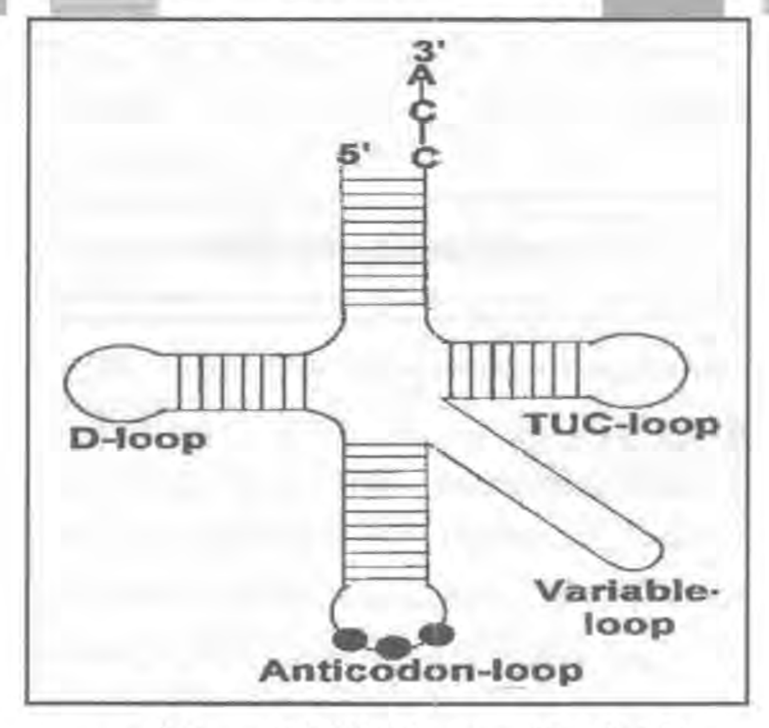
$7\text{-}CH_3$ -Guanosine-P P P AUG UAA AAAAAAA AAAAAAA A
Cap Poly A Tail

شكل (2 – 5). الـmRNA الناضج بعد إجراء التحويرات عليه

يتم نسخ الـmRNA في النواة من خلال استنساخ تسلسل من الـDNA لجين مُعيّن على أساس التكامل القاعدي (Base complementary rule)، وباستخدام الشريط ضد الحساس (Antisense strand) للـDNA كقالب. يحمل الـmRNA المعلومات الوراثية (الشفرات Codons) لتصنيع البروتين، إذ إن كل حامض أميني يتم تمثيله بوساطة تسلسل من ثلاث نيوكليوتيدات، أي أن الشفرة يتم تمييزها من خلال الشفرة المضادة (Anticodon) الواقعة على الـtRNA.

2. الـtRNA الناقل (Transfer RNA (tRNA:

يُعدّ الـtRNA من أبسط واصغر أنواع الـtRNA، وهو يتكوّن من 73 – 93 نيوكليوتيدة طولاً، ويُشبه الـmRNA في كونه يستنسخ من جينات خاصة، ويحتاج إلى معاملات بعد استنساخه لإزالة الانترونات، وتتعرض كذلك قواعده إلى تحويرات كبيرة، إذ يُضاف التسلسل 3′-ACC المستقبل للحامض الأميني (3′-ACC amino acid acceptor sequence) بعد الاستنساخ. ويتميّز بوجود الأواصر الهيدروجينية بين بعض التسلسلات التي تُعطيه الشكل الشبيه بورقة البرسيم (Clover leaf like shape)، ذو ثلاث عروات Three loops (عروات أو أذرع)، مع عروة إضافية (Extra loop) وطرفين حرّين يتمثّلان بالنهاية 3′-end والبداية 5′-end. يحمل الـtRNA الأحماض الأمينية التي ترتبط مع النهاية ′3 وينقلها إلى الرايبوسومات لتصنيع البروتين، ولهذا فإن لكل حامض أميني tRNA خاص بنقله، بمعنى وجود 20 نوع من الـtRNA، (شكل 2 – 6).

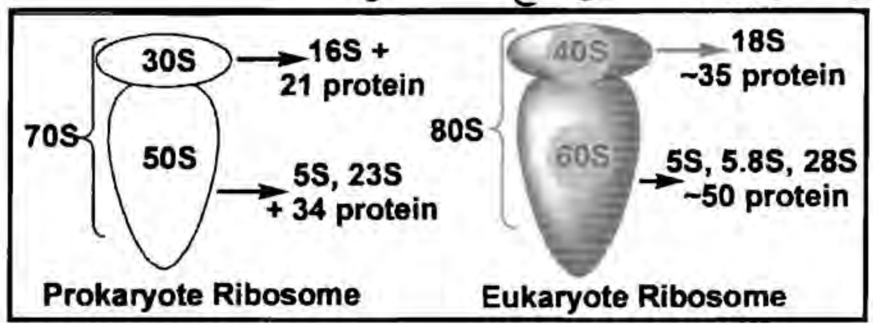


شكل (2 – 6). موديل الـtRNA الشبيه بورقة البرسيم

3. الـRNA الرايبوسومي Ribosomal RNA (rRNA):

تتجمّع أنواع الـrRNA مع بعض البروتينات لتكوين الرايبوسومات التي تمثّل موقع تصنيع البروتين، ويُصنّف طبقاً لمعدل طوفانه خلال عملية الطرد المركزي في محلول الـNaCL بوحدات سفدبيرك (Svedberg units)، أي إلى 23S و 16S و 5S في بدائيات النواة (Prokaryotes) والمايتوكوندريا، وإلى 28S و 18S و 5.8S و 5S في حقيقيات النواة (Eukaryotes) والتي تتكوّن من 4700 و 1900 و 160 و 120 نيوكليوتيدة طولاً على التوالي. ففي حقيقيات النواة تكون الرايبوسومة 80S بالحجم، والتي تتشكّل من وحدتين ثانويتين (Two subunits): 60S و 40S، إذ تتكوّن الوحدة الثانوية 60S من ما يقارب 50 جزيئة بروتينية، و rRNA من الأنواع 5S و 5.8S و 28S. أما الوحدة الثانوية 40S فهي تتكوّن من ما يقارب 35 جزيئة بروتينية ، و rRNA من النوع 18S. وفي بدائيات النواة تكون الرايبوسومة 70S بالحجم وتتشكل من وحدتين ثانويتين: 50S و 30S، إذ تتكوّن الوحدة الثانوية 50S من ما يقارب 34 جزيئة

بروتينية، و rRNA من الأنواع 23S و 5S. أما الوحدة الثانوية 30S فتتكوّن من ما يقارب 21 بروتين وrRNA من النوع 16S، (شكل 2 – 7).



شكل (2 – 7). رايبوسومات بدائية وحقيقية النواة

تنظيم الكروماتين Chromatin organization:

إن المحتوى الكلي من Protein / RNA / DNA في النواة يدعى بالكروماتين، ويدعى جزء الـDNA منه بالجينوم (Genome). كما أن طول الـDNA النووي البشري أُحادي المجوعة الكروموسومية (Haploid human nuclear DNA) هو بحدود 1 متر (3×10^9 زوج قاعدي bp)، في حين أن قطر الخلية الكلي هو 20 ميكروميتر، وقطر النواة 5 – 10 ميكروميتر. تتغاير نواة الخلية في بعض الاعتبارات اعتماداً على نوع الخلية والفعالية، أي قد تكون صغيرة أو متوسطة أو كبيرة بالحجم، أو مركزية أو طرفية أو محيطية أو عند القاعدة في الموقع، مستديرة أو قضيبية أو كلوية أو مُسطّحة بيضوية أو فصيّة في الشكل. والخلية قد تكون أحادية النواة (أغلب خلايا الجسم)، أو ثنائية النواة (مثل الخلايا البارنكيمية للكبد)، أو عديدة الأنوية (مثل الخلايا العضلية الهيكلية). لذلك فإن الـDNA يتكثّف ليحتل حيّز صغير، وهذا التكثّف يحتاج إلى أسلوب تنظيمي جيد لكي يسهل التعامل معه خلال عمليتي الاستنساخ والتضاعف. إن تركيب الجينوم في هذه الهيئة التنظيمية يُدعى بالكروماتين، وهذا التنظيم يتطلّب التداخل مع بعض البروتينات و الـRNA. وعليه يتكوّن الكروماتين من شريط مزدوج من الـDNA والهستونات Histons (بروتينات قاعدية Basic proteins)، وبروتينات

غير هستونية (بروتينات قاعدية أخرى مثل البروتامينات Protamines)، وكمية صغيرة من الـRNA.

الهستونات هي بروتينات قاعدية غنية جداً باللايسين والأرجنين، ولذلك فهي ذات شحنة موجبة، وترتبط مع جزئيات الـDNA ذات الشحنة السالبة بالأواصر الأيونية (Ionic bonds)، وتكون الهستونات على خمسة أنواع، وهي H1 , H2A , H2B , H3 , H4.

أما بالنسبة للاهستونات (Nonhistons)، فتتواجد هذه البروتينات سويّةً مع الـDNA، ويصعب عزلها، وتضم ما لا يقل عن 20 نوعاً رئيسياً، فضلاً عن مئات الأنواع من البروتينات الثانوية. تكون اللاهستونات حامضية المحيط، واسعة الانتشار، ولكن نسبتها إلى DNA الكروماتين متغايرة وغير ثابتة. وعلى العموم فإن الخلايا الحاوية على العديد من الجينات الفعّالة بعمليات الاستنساخ تكون متميّزة باحتوائها على نسب أكبر من البروتينات اللاهستونية. تُعدّ عملية تغيير اللاهستونات عملية مُنظّمة وذات آلية أكثر تخصصاً في السيطرة على جينات مُعيّنة، أي أن لها دوراً تركيبياً في تنظيم الكروموسوم. كما يتم بناء هذا النوع من البروتينات خلال دورة حياة الخلية.

النيوكليوسوم Nucleosome:

إن الوحدة الترزيمية (Packing unit) للكروماتين تُدعى بالنيوكليوسوم، إذ يتكوّن النيوكليوسوم من مركز هستوني (Histone core) مُكوّن من ثمان جزئيات هستونية: اثنتان H2A، اثنتان H2B، اثنتان H3، اثنتان H4. ويلتف على سطح النيوكليوسوم ما يقارب 1.75 لفة من الـDNA (146 نيوكليوتيدة طولاً). وهنالك DNA رابط (30 نيوكليوتيدة طولاً) يشدُّ بين المراكز النيوكليوسومية، تتخلّله جزئية واحدة من الهستون H1، إذ يتم من خلال ذلك لفتين من الـDNA.

لا تقوم الهستونات بدور تركيبي غير فعّال فقط، ولكن لها دوراً تنظيمياً أيضاً حيثما توجد للقيام بالتحوير التساهمي، مثل عمليات الأستلة (Acetylation)، والفسفرة (Phosphorylation) للقيام بتسريع أو إبطاء معدّل الاستنساخ، وهذا يؤثّر أيضاً على تكشّف الكروموسومات خلال التضاعف، وعملية الـADP-ribosylation خلال إصلاح الـDNA (DNA repair).





لذلك فإن تنظيم الشريط المزدوج للـDNA في النيوكليوسومات يجعله يبدو شبيهاً بالخرزات في المسبحة، على شكل ليف قطره 10 نانوميتر. وهذا الليف يلتف مرةً أخرى حول محور مُجوّف خيطي على شكل حلزون مكوّن من 6 – 7 نيوكليوسومات لكل لفة، ليكون ليف قطره 30 نانوميتر. وينتظم هذا الأخير في عروات (Loops) أو قباب (Domains) بواسطة منصات بروتينية في كروموسوم الطور البيني المُمتد، وكل منها يتضمّن 30000 – 100000 نيوكليوتيدة، والتي تُشكّل جزر وراثية مفصولة بسمك 30 نانوميتر.

عندما تقترب الخلية من الدخول في الانقسام (Mitosis)، فإن الكروماتين يتكثّف أكثر بطول 100 ضعف حتى يبدو بهيئة كروموسوم انقسامي مُميّز بسمك 1400 نانوميتر. إن الكروماتين ذو النشاط الاستنساخي، حيث تكون جيناته فعّالة، يُدعى بالكروماتين الحقيقي (Euchromatin)، ويصطبغ بلون باهت عند تصبيغه بالصبغات القاعدية (Basic dyes)، ويكون غير مُتكثّف، ويُشكّل الغالبية من الكروماتين المُلاحظ في نوى الطور البيني، ويكون مُنتشراً في النواة ولا يمكن ملاحظته بالمجهر الضوئي. ولكن الكروماتين الذي يصطبغ بلون غامق بالصبغات القاعدية يُدعى الكروماتين المُتباين (Heterochromatin)، ويشتمل على مناطق كروموسومية تبقى مُتكثفة خلال الطور البيني. يُعتبر الـDNA في الكروماتين المتباين غير نشط (خامل وراثياً) ، ويكون موقعه إما مُترافقاً مع الغلاف النووي، ويسمّى بالكروماتين المحيطي (Peripheral chromatin)، أو حول النوية ويسمّى الكروماتين المرافق للنوية (Nucleolus-associated chromatin)، أو مُنتشراً بشكل حُبيبات كروماتينية في حشوة النواة ويسمّى جزر الكروماتين (Chromatin islands). ويمثّل الكروماتين المتباين الحُزم الغير فعّالة المُتكثّفة من الكروموسومات، وكذلك يُشكّل الذراع p في الكروموسومات شبه طرفية السنترومير (Acrocentric chromosomes)، إذ إن فقدانه لا يؤدّي إلى تأثيرات مُضرّة في انتقال Robertsonian translocation المتوازن. ويتضاعف في مراحل متأخّرة من دورة الخلية، ويُقسم إلى نوعين:

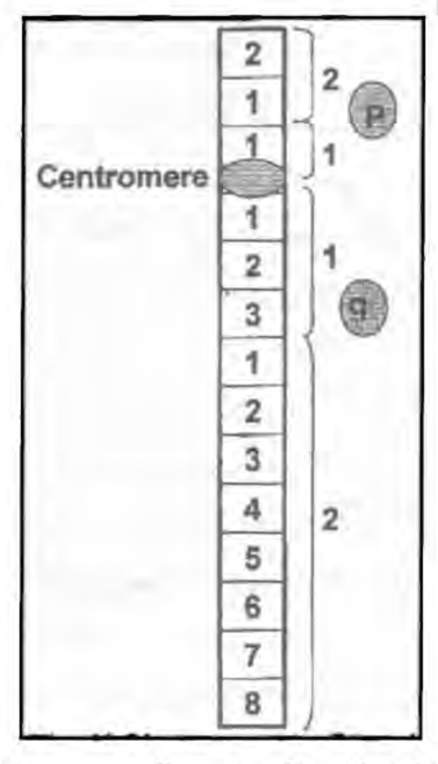
أ. الكروماتين المتباين الاختياري Facultative heterochromatin.

ب. الكروماتين المتباين التكويني Constitutive heterochromatin.

يختلف الكروماتين المتباين الاختياري من نسيجٍ إلى آخر، ويمثّل المناطق الكروموسومية التي تكون خاملة في بعض أنواع الخلايا، كما أن كمية هذا الكروماتين تكون قليلة جداً في الخلايا الجنينية، ويمكن أن يكون بكميات وفيرة في الخلايا المُتمايزة، ولذلك يُعدّ وسيلة مهمّة في غلق المعلومات الوراثية خلال التمايز أو التطوّر.

أما بالنسبة للكروماتين المتباين التكويني، فإن يمثّل المناطق الكروموسومية الغالبة من الكروماتين المُتكثّف، لذلك يكون خامل وراثياً في جميع الخلايا، وفي الإنسان يتمثّل في مناطق الـDNA الموجودة في السنترومير (Centromer أو يُسمّى Kinetochore) وهي المنطقة التي من خلالها يرتبط كروماتيدي الكروموسوم مع بعضهما، وكذلك يرتبط بوساطتها الكروموسوم مع خيوط المغزل أثناء الانقسام . إن النمط الكروماتيني يُعدُّ دليلاً لفعّالية الخلية ، إذ إن الخلايا ذات النوى الباهتة تُعدُّ أكثر فعّاليةً في تصنيع البروتين مُقارنةً بالنوى الداكنة .

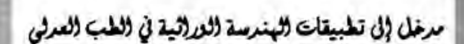
في الجميتات (البيوض والحيوانات المنوية) يكون الجينوم في هيئة كروموسومية أحادية (Haploid)، وبحدود 3×10^9 زوج قاعدي، وهو نصف العدد مقارنةً بالخلايا الجسمية. لذلك فالجميتات البشرية تحتوي على 22 كروموسوم جسمي (22 Autosomal chromosomes)، وكروموسوم جنسي واحد (One sex chromosome)، بحيث يكون X في الجميتة الأنثوية، و Y في الجميتة الذكرية. إن كل كروموسوم في الطور الاستوائي مُكوّن من كروماتيدتين مرتبطتين بواسطة السنترومير، إذ يتكّون الكروماتيد من جزيئة واحدة من DNA مزدوج الشريط بحدود 1.3×10^8 نيوكليوتيدة، ويمتلك ذراعين، القصير (Petit = p) والطويل (Grand = g = q). وكل من هذين الذراعين يُقسم إلى مناطق regions (1، 2،...) والتي تُقسم إلى حُزم bands (1، 2، 3، 4، ...) ابتداءً من السنترومير، انظر الشكل (2 – 8) الخاص بالكروموسوم X.



شكل (2 – 8). تركيب الكروموسوم X

في الخلايا الجسمية يكون الجينوم ثنائي المجموعة الكروموسومية (Diploid ضعف عدد الكروموسومات الموجودة في الجميتات)، ولذلك فإن كل خلية جسمية بشرية تحتوي على 22 زوج من الكروموسومات الجسمية المتناظرة (Homologous autosomal chromosomes)، وكروموسومين جنسيين، وهما XX في الخلايا الأنثوية، أو XY في الخلايا الذكرية.

هنالك ما يقارب 10^5 جين (ما يقارب 100000 ببتيد متعدد) في كل خلية، والتي تُشكّل فقط 10٪ من تسلسلات الـDNA الكلي ، والمُتبقّي من الـDNA (90٪) والذي يُمثّل تسلسلات من الـDNA موجودة في الجين ذات أهمية في إنجاز وظائف تنظيمية، وتحتوي خلايا الكبد والكلية على 10000 – 15000 بروتين فقط، بسبب التعبير الخاص بالنسيج (Tissue-specific expression) للجينات.



النواة Nucleus:

تُحاط النواة بغلاف نووي ثنائي الأغشية، بحيث يكون الغشاء الخارجي مستمر مع الشبكة الأندوبلازمية، في حين أن الغشاء الداخلي يُسند بواسطة صفيحة ليفية (Fibrous lamina). يتخلّل الغلاف ثقوب تسمح بتبادل الجزيئات الكيمياوية مع السايتوبلازم. كما تحتوي النواة على سائل يسمّى Karyoplasm يحتوي على بروتينات وأيونات ومواد أيضية ودهون وجزيئات RNA صغيرة.

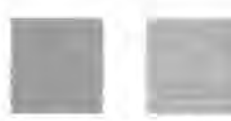
تحتوي الخلايا الجسمية الأنثوية في الطور البيني على كروماتين يصطبغ بكثافة بهيئة كتلة مُميّزة بالقرب من الغلاف النووي، وهو كروموسوم X غير نشط، إذ يكون مُتراصّاً بسبب تضاعفه المُتأخّر، مقارنةً بالكروموسومات الأخرى، ويبقى مُتكاثفاً إلى وقت مُتأخّر مقارنةً ببقيّة الكروموسومات، ويُدعى كروماتين X (X chromatin) أو جسم بار (Bar body).

النويّة Nucleolus:

وهي منطقة تتواجد في النواة، لا تُحاط بغشاء، وتصطبغ بشدّة بسبب ترافق حدودها مع الكروماتين المتباين، تتمثّل بتركيب كروي، وتُلاحظ فقط في نوى الطور البيني (Interphase nucleus). تصطبغ النوية بالصبغات القاعدية بسبب وفرة الـrRNA والبروتينات فيها، كما أنها تحتوي على كميات قليلة من الـDNA غير النشط، وكذلك تحتوي على تسلسلات تابعة (Satellite sequences) للكروموسومات 13، 14، 15، 21، 22، تتضمّن جينات مُشفّرة للـrRNA. هذا وتُعدّ النوية المكان الذي يُستنسخ منه rRNA، والتجميع المبدئي للجسيمات الرايبوسومية. كما أن الخلية قد تحتوي على واحد أو أكثر من النويات، وخصوصاً تلك التي تكون نشيطة في تصنيع البروتين، مثل الخلايا العنبية البنكرياسية (Pancreatic acinar cells).

تتكوّن النويّة من ثلاثة مناطق مُتميّزة، وهي:

1. منطقة Pars granulosa: تتشكّل من حُبيبات كثيفة إلكترونياً (Electron dense granules)، تمثّل تراكم من rRNA مع بروتين رايبو نيوكليوتيدي.



2. منطقة Pars fibrosa: تتشكّل من خويطات مُرزّمة بقوة دقيقة كثيفة إلكترونياً (Electron dense fine tightly packed filaments)، والتي تمثّل rRNA مُستنسخ حديثاً.

3. مناطق تنظيم النويّة NORs (Nucleolar organizer regions): وهي مناطق مستديرة ذات كثافة منخفضة، تمتلك جينات خاصة نويوية (Nucleolar genes)، إذ إن هناك خمسة أزواج من الكروموسومات تحتوي على مناطق تنظيم نويوية NORs، حيث المواقع الجينية (Gene loci) المُشفّرة للـrRNA، والتي تقع على الكروموسومات رقم 13، 14، 15، 21، 22 المُشار إليها أعلاه.

الحشوة النووية Nuclear matrix:

وهي المُكوّن الذي يملأ الفراغ بين الكروماتين والنويّة، وتتكون من بروتين و RNA و بعض الـDNA. ها وتشترك الحشوة في عملية الاستنساخ الجيني، وكذلك تجهّز مواقع التكرار (Replication sites) لعملية تضاعف (Duplication) الـDNA الكروموسومي.

وظائف النواة Function of the Nucleus:

يمكن تلخيص أهم وظائف النواة بالآتي:

1. توجيه عملية الانقسام الخلوي (Cell division).
2. حمل المعلومات والصفات الوراثية للكائن الحي.
3. توجيه عمليات تصنيع البروتين والفعاليات الأخرى للخلية.
4. تكوين الـRNA.

DNA المايتوكوندريا Mitochodrial DNA:

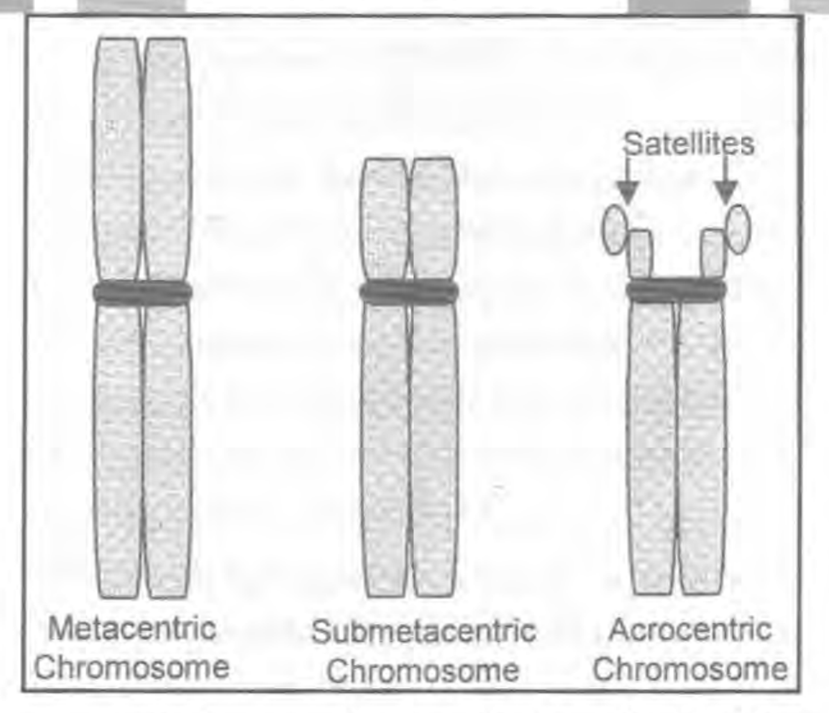
وهو عبارة عن DNA مزدوج الشريط دائري (Circular double stranded DNA)، بحدود 16 كيلو زوج قاعدي طولاً، وبوجود اختلافات قليلة عن DNA النواة بخصوص معنى الشفرات الوراثية، وهو يُشفّر إلى نوعين من rRNA و 22 tRNA، ووحدات ثانوية

بروتينية لأربعة إنزيمات تشترك في إنتاج الطاقة. وطالما أن أغلب المايتوكوندريا في الزايجوت (Zygote) تأتي من البيضة (مئات الآلاف)، مقارنةً بالحيوانات المنوية (بضع مئات)، فإن الطفرات في تلك الإنزيمات سوف تتّخذ نمطاً أمومياً (Maternal pattern) للتوريث غير المنلي للأمراض المايتوكوندرية. ومن الأمثلة على مثل هذه الأمراض MELAS (Myopathy: الاعتلال العضلي، Encephalopathy: اعتلال الدماغ، Lactic acidosis: حموضة اللاكتيك، Stroke-like episodes: العوارض الشبيهة بالسكتة)، وهي أمراض وراثية أمومية، بسبب نقص مُعقّد I و IV.

إن هذا الـDNA يتضاعف بنفسه خلال الطور G1 من دورة الخلية .

كروموسومات الطور الاستوائي Metaphase chromosomes:

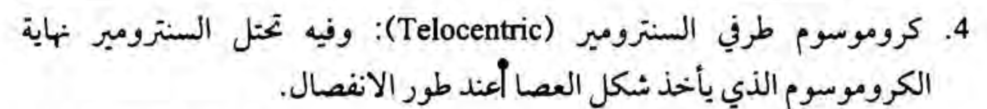
وهي تتكوّن من DNA فائق الالتفاف (Super-coiled DNA) بحيث يتم هذا الالتفاف بمساعدة بروتينات مُنظّمة، إذ تُصنّف هذه الكروموسومات حسب طولها الكلي وموقع السنترومير ونمط التخريم. فقد تكون وسطية السنترومير (Metacentric chromosome)، أو شبه طرفية السنترومير (Acrocentric chromosome)، التي قد تمتلك أحياناً بروز يُشبه العصى (Stick-like antenna) يُسمّى التابع (Satellite) يحتوي على التسلسلات المُشفّرة للـrRNA، وهي تكون مُنظّم DNA النويّة (Nucleolus DNA organizer)، الذي يُلاحظ في الطور البيني Interphase. أو تكون بينية السنترومير (Intermediate chromosome)، أو ما يُطلق عليها بالكروموسومات شبه وسطية السنترومير (Submetacentric chromosome)، (شكل 2 – 9).



شكل (2 – 9). تصنيف الكروموسومات حسب موقع السنترومير

هذا مع العلم أن بعض المصادر العلمية تُشير إلى أن تصنيف الكروموسومات يكون على أربعة أصناف بدلاً من ثلاثة ، وهي كما يأتي:

1. كروموسوم وسطي السنترومير (وسطي التمركز **Metacentric**): وهو الكروموسوم الذي له ذراعان متساويان بالطول، وتكون القطعة المركزية (السنترومير) قرب وسط الكروموسوم الذي يظهر على شكل حرف V باللغة الإنجليزية أثناء طور الانفصال.
2. كروموسوم شبه وسطي السنترومير (تحت وسطي **Submetacentric**): وهو الكروموسوم الذي له ذراعان غير متساويان بالطول، ويظهر بشكل حرف L باللغة الإنجليزية أثناء طور الانفصال.
3. كروموسوم شبه طرفي السنترومير (**Acrocentric** أو **Subtelocentric**): وينتج عندما تقع السنترومير قرب إحدى نهايتي الكروموسوم مُكوّنةً ذراعاً طويلاً نسبياً وآخر قصير جداً، ويأخذ هذا الكروموسوم شكل العصا بنهاية قصيرة ملتوية 1.



4. كروموسوم طرفي السنترومير (Telocentric): وفيه تحتل السنترومير نهاية الكروموسوم الذي يأخذ شكل العصا عند طور الانفصال.

وفي الحقيقة يوجد شك كبير في إمكانية وجود سنترومير طرفية بالمرّة في الطبيعة في أي كائن حي تحت الظروف الطبيعية، إذ إن ذلك يعني أن السنترومير قد تقوم في هذه الحالة بوظيفة التيلومير، وهذا أمر مُستبعد. ربما يكون أقرب مثال إلى ذلك ما وجد في أحد الأوليات Protozoa من الفصيلة Barbulanympha، إذ لوحظ أن الكروموسومات فيها تكون مُلتصقة بصفة دائمة بالغشاء الداخلي للغلاف النووي، وتكون طرفية السنترومير. وقد يُفسّر هذا الالتصاق على أنه طريقة لإعطاء درجة من الثبات لبعض عناصر الكروموسومات غير المُستقّرة.

لقد أمكن الحصول على كروموسومات طرفية السنترومير صناعياً بإحداث كسر في منطقة السنترومير نفسها، ولكن عادةً ما تكون تلك الكروموسومات غير مستقرّة، ومن الصعب بقائها واستمرارها في الجينوم.

وقد يحتوي الكروموسوم في بعض الأحيان غير الطبيعية على سنتروميرين، فيُقال له ثنائي السنترومير (Dicentric) والذي يؤدي في العادة إلى شذوذ في حركة الكروموسوم، وتكوين جسور كروماتيدية.

وبخصوص الإنسان وجد أن الكروموسومات 1، 2، 16، 19، 20، تكون وسطية السنترومير، بينما تكون الكروموسومات 13، 14، 15، 21، 22 وكذلك كروموسوم Y شبه طرفية السنترومير، وتكون بقية الكروموسومات شبه وسطية، ولم يُلاحظ وجود كروموسومات طرفية في الإنسان إطلاقاً.

مفهوم الجين Gene concept

الجين (تسلسل من الـDNA) هو جزء من الجينوم، يُشفّر إلى RNA خاص (snRNA ، rRNA ، tRNA ، mRNA). إن هذا التسلسل من الـDNA يتضمّن أساس الجين (Gene proper) الذي يستنسخ بالضبط إلى RNA والتسلسلات المُنظّمة. يُشفّر mRNA إلى سلسلة متعدد الببتيد أو إلى جزء من متعدد الببتيد، في حين يقوم كل من tRNA و rRNA بوظيفتهما المناسبة في تصنيع البروتين.

إن كل جين يحتل موقع معروف جيداً على الكروموسوم، أي ما يُسمّى بموقع الجين (Gene locus). إذ يُشار إلى أليلات (Alleles) الجين على أنها زوج أو سلسلة من الجينات ذات العلاقة التي تحتل الموقع نفسه على الكروموسومات المتناظرة. وهذه الأليلات قد تكون متشابهة (Homozygous) أو قد تكون مختلفة (Heterozygous). هذا ويحدّد فعل الجين التركيب الوراثي (الطراز الوراثي Genotype)، أي كون تلك الأليلات مُتنحّية أو تراكمية أو مُساندة أو سائدة. وفي التوريث السائد يكون أحد الأليلات سائداً Dominant، أي يُعبّر عن تأثيره في الطراز المظهري (Phenotype)، والأليل الآخر يكون مُتنحّياً Recessive (غير فعّال ولن يشارك في الطراز المظهري).

إن رحمة الخالق عزّ وجل جعلت من التوريث الجيني المُسيطر على الأمراض الوراثية يتم بأسلوب مُتنحّي. وهذا يعني بأن كل من أليلي الجين (أو الأليلات الأخرى لهذا الجين) يجب أن يكونا حاملين للخلل لظهور المرض.

في الذكور لا تمتلك الجينات الموجودة على الكروموسوم الجنسي X نسخ (أليلات) على الكروموسوم الجنسي الذكري Y، ولذلك في الأمراض الوراثية المرتبطة بالجنس (Sex-linked inherited diseases) تكون الإناث عادةً حاملة (Carriers) للمرض، في حين يكون للذكور فرصة أكثر للإصابة، لامتلاكهم أليل واحد فقط.

تضاعف الـDNA (تصنيع الـDNA)

DNA Replication (DNA synthesis)

التضاعف هو تكرار محتوى الـDNA قبل الانقسام، أي أن نسختي الـDNA المتكوّنة تنقسم بشكل متساوي بين الخليتين البنويتين الجديدتين، إذ إن كل شريط قديم سوف يُطبع عليه شريط جديد مُتمّم، ولذلك فالتضاعف يكون بأسلوب شبه محافظ (Semi-conservative) في طبيعته، والذي يعني بأن كل خلية بنوية سوف تستقبل شريط DNA من الخلية الأمية، وشريط مُتمّم مُصنّع حديثاً. وهذا يقع في سياق ما تم توقّعه من قبل العالمان Watson و Crick (1953)، وحسب الآتي:

إن الموديل الحالي للـDNA يُبيّن احتوائه على زوج من القوالب، كل واحد منهما يكون مُتمّماً للآخر، وعليه يمكن تخيّل كون الفترة قبيل التضاعف تتضمّن تكسّر الأواصر الهيدروجينية، وحدوث انفلال للسلسلتين وانفصالهما عن بعضهما البعض، ثمّ تعمل كل سلسلة كقالب لتكوين سلسلة مرافقة جديدة، وفي النهاية يجب أن نحصل على زوجين من السلاسل، في حين الموجود سابقاً فقط زوج واحد. علاوةً على ذلك، فإن التسلسل لأزواج القواعد سوف يتضاعف بشكل دقيق.

الإنزيمات المشاركة في تضاعف الـDNA

Enzymes participating in DNA replication

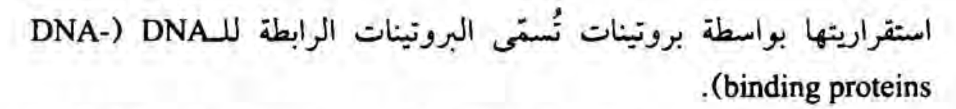
في بدائيات النواة، فضلاً عن الإنزيمات التالية، لا بُدّ من وجود 10 بروتينات إضافية، مثل البروتينات المرتبطة بالـDNA مفرد الشريط SSBPs (Single stranded DNA binding proteins)، والتي تمنع عودة التفاف حلزون الـDNA من خلال ربط الشريط المفرد للـDNA المتكوّن بفعل إنزيم الـHelicase بدون التداخل مع وظيفة إنزيم الـDNA polymerase.

أ. إنزيم الـ DNA polymerase I: ويكون مسؤولاً عن ملء الثغرات من خلال ترجمة الثغرات الناتجة من إزالة بوادئ الـRNA (RNA primers) المستخدمة خلال تضاعف الـDNA في سلسلة الـDNA.

ب. إنزيم الـ DNA polymerase II: يمتلك وظيفة كمصحح للبروفات التضاعفية، فضلاً عن وظيفته الإصلاحية للـDNA (DNA repair).

ج. إنزيم الـ DNA polymerase III: وهو الإنزيم الرئيس المسؤول عن تضاعف الـDNA.

د. إنزيم الـ DNA helicase: يعمل على فل الحلزون المزدوج للـDNA إلى شريطين مفردين، إذ يعمل على تكسير الأواصر الهيدروجينية بين القواعد النيتروجينية وبالاعتماد على طاقة الـATP، إذ يتم استهلاك جزيئتين من الـATP لكسر كل زوج قاعدي. وحال الانفصال وتكوين الأشرطة المفردة، فإنه يتم المحافظة على



استقراريتها بواسطة بروتينات تُسمّى البروتينات الرابطة للـDNA (DNA-binding proteins).

ه. إنزيم الـ Primase: وهو إنزيم بلمرة للـRNA يعتمد على الـDNA (DNA-dependent RNA polymerase) والذي يعمل على تصنيع بوادئ RNA قصيرة (Short RNA primers) بحدود 5 – 200 قاعدة وبمساعدة البروتين الرابط للـDNA المُسمّى (Primosome). إن بادئ الـRNA يكون مُتمّماً ومُعاكساً في الاتجاه للـDNA الذي يعمل الـPrimase على استخدامه في التصنيع. يتطلّب إنزيم الـDNA polymerase III يتطلّب البادئ للاستمرار عند بداية عملية التضاعف، إذ يمتلك البادئ على نهاية OH – ′3 حرة تستقبل النيوكليوتيدات الرايبوزية منقوصة الأوكسجين التي تُضاف من قبل إنزيم الـ DNA polymerase III.

و. إنزيم الـ DNA gyrase: يعمل على إزالة الالتفافات الفائقة الموجبة (Positive supercoils)، وإدخال اللف الفائق السلبي.

ز. إنزيم الـ DNA ligase: ويعمل على ربط (لصق) النهاية OH – ′3 الواقع عند ذرة الكاربون C3 عند إحدى النهايات مع النهاية OH – ′5 الفوسفاتية الأخرى للـDNA عند ذرة الكاربون C5.

في حقيقيات النواة In eukaryotes:

إن إنزيمات بلمرة الـDNA في اللبائن تتمثّل بالأنواع الخمسة التالية: DNA polymerase – α, β, γ, δ, ε، إذ يعمل إنزيم DNA polymerase δ على إنجاز وظيفة الـDNA polymerase III. أما إنزيم DNA polymerase α فيعمل على إنجاز وظيفة إنزيم الـ DNA polymerase I. ويُشابه الـ DNA polymerase ε إنزيم الـ DNA polymerase II من حيث وظائفه التصحيحية للبروفات التضاعفية والإصلاحية. كما ويمتلك إنزيم الـ DNA polymerase β وظيفة إصلاحية. وفيما يتعلّق بإنزيم الـ DNA polymerase γ فهو إنزيم بلمرة للـDNA في المايتوكوندريا (جدول 2 – 1).

جدول (2 – 1). مقارنة لأنواع ووظائف الإنزيمات المشتركة في تضاعف الـDNA في بدائيات وحقيقيات النواة

الوظيفة	بدائيات النواة	حقيقيات النواة
ترجمة الثغرة في الـDNA والإصلاح (DNA nick translation and repair)	Polymerase I	Polymerase α
تضاعف الـDNA (DNA replication)	Polymerase III (+ تصحيح البروفات التضاعفية Proofreading)	Polymerase δ
تصحيح البروفات التضاعفية والإصلاح (DNA proofreading and repair)	Polymerase II	Polymerase ε
إصلاح الـDNA (DNA repair)	-	Polymerase β
تضاعف DNA المايتوكوندريا (Mitochondrial DNA replication)	-	Polymerase γ

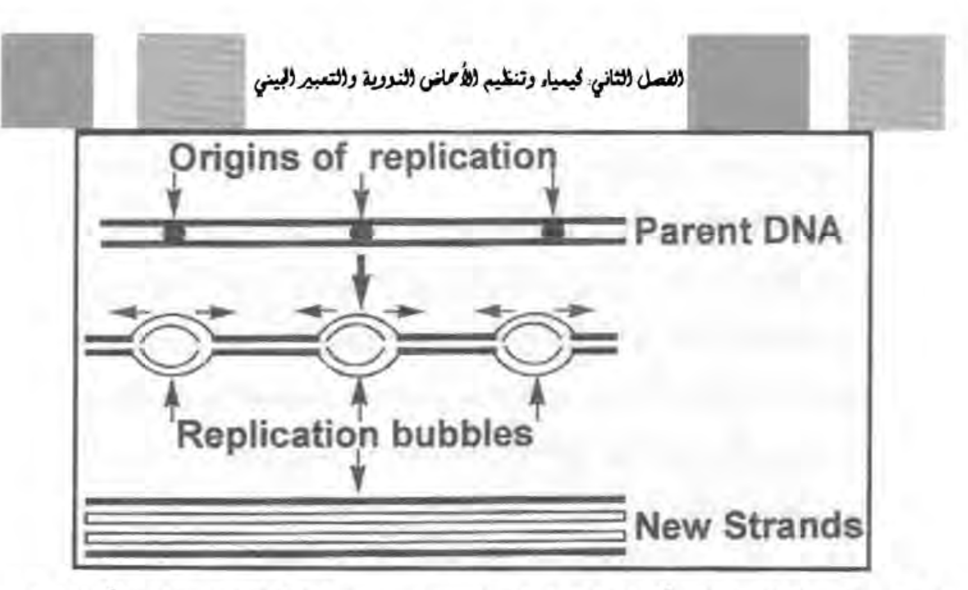
مواقع تضاعف الـDNA Sites of DNA replication:

في بدائيات النواة:

يكون فيها شريط الـDNA بطول محدود، ولذلك يبدأ التضاعف في موقع مفرد عنده يتم انفصال شريطي الـDNA عن بعضهما، ويسمّى هذا الموقع بأصل التضاعف Origin of replication (OriC)، إذ يمتلك هذا الموقع تسلسل نيوكليوتيدي خاص يتم تمييزه بواسطة الإنزيمات والبروتينات المسؤولة عن بدء تضاعف الـDNA.

في حقيقيات النواة:

يحدث التضاعف في مواقع تضاعف متعدّدة بشكل متزامن، إذ تنفصل الأشرطة المزدوجة عن بعضها، لضمان تضاعف سريع في شريط الـDNA الطويل في هذه الكائنات (شكل 2 – 10).



شكل (2 – 10). مواقع أصل التضاعف التي تتوسع بكلا الاتجاهين على هيأة فقاعات تضاعف

إنزيمات أخرى في حقيقيات النواة تشترك في تضاعف الـDNA:

أ. إنزيم الـ Topoisomerase I: يحدث خلال الانفصال الأشرطة للـDNA التفاف فائق موجب، وهذا يجعل من عملية التقدم المستمر لشوكة التضاعف أمراً صعباً، وبدلاً من التدوير الكلي للكروموسوم مقابل شوكة التضاعف، (هذا يحتاج إلى كمية كبيرة من الطاقة)، فإن إنزيم الـ Topoisomerase I يُحدث ثغرة (عملية قطع) في شريط مفرد في حلزون الـDNA، بحيث تصبح كل نهاية في هذا الشريط حرّة لتدور في اتجاهات متعاكسة من الالتفاف الفائق لاسترخاء حلزون الـDNA، ثمّ يعمل الإنزيم على لصق الثغرة مرّةً أخرى. إن مصطلح الالتفاف الفائق الموجب Positive supercoiling يعني التفاف حلزون الـDNA باتجاه يميني (Right-handed DNA helix) حول محوره، بحيث تدور لفّاته باتجاه عقرب الساعة، ويحدث في الـDNA الخيطي والحلقي مع نهايات ثابتة.

ب. إنزيم الـ Topoisomerase II (أو إنزيم الـGyrase في بدائيات النواة): يعتمد هذا الإنزيم على ATP، وهو يُسهّل عملية الانفصال في الحلزون المزدوج من خلال إزالة الالتفاف الفائق الموجب، إذ يتم ذلك بواسطة قطع الأشرطة المزدوجة، بحيث تُترك النهايات لتسترخي. وتحدث الالتفافات الفائقة السالبة (Negative

supercoils)، ثمّ عملية اللصق لها. هذا ويحدث الالتفاف السالب في الـDNA الدائري والخيطي مع نهايات ثابتة، وينتج بسبب برم حلزون الـDNA ذو الالتفاف اليميني حول محوره باتجاه معاكس لعقرب الساعة بالنسبة للفّاته، ويُفضّل في الأنظمة البيولوجية، لأنه يسهل انفصال حلزون الـDNA إلى أشرطة مفردة.

إن الخطوات التمهيدية أعلاه تولّد تركيب يُشبه الشكل V (V-shaped structure) والذي يُسمّى بشوكة التضاعف (Replication fork) والذي يستمر بالاتجاهين الأعلى والأسفل لحلزون الـDNA، أي أن التضاعف يحدث في كِلا الاتجاهين بالنسبة لفقاعة التضاعف (Replication bubble).

خطوات التضاعف Steps of replication:

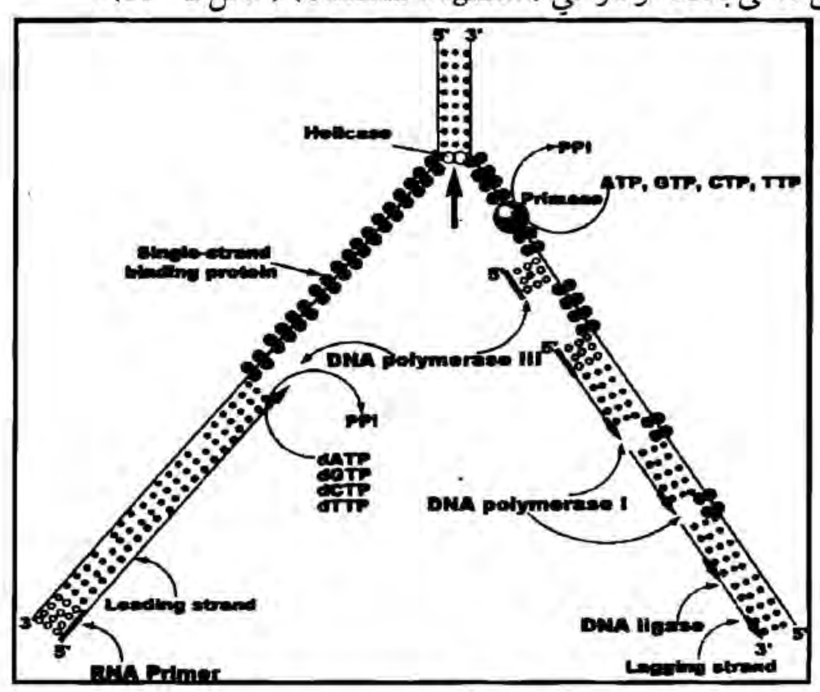
يحتاج التضاعف إلى الوحدات البنائية المتمثّلة بالـdATP ، dGTP ، dTTP ، dCTP بكميات متوازية بشكل جيّد.

وعند المنطقة المتمثّلة بأصل التضاعف (OriC) يعمل إنزيم الـHelicase المُعتمد على الـATP (بمساعدة الـdnaA الذي يرتبط مع مواقع خاصة والـdnaC) على فل التفاف الـDNA، لتسهيل ارتباط البروتين المُرتبط مع الـDNA مفرد الشريط SSBP، الذي يعمل على استقرارية الـDNA بهيئة شريطية مفردة. وهذه العملية تحدث في الالتفاف الفائق الموجب للـDNA والذي يتم تخفيفه بواسطة الالتفاف الفائق السالب الذي يتم مقابل شوكة التضاعف بواسطة إنزيم الـDNA gyrase.

يعمل إنزيم الـPrimase على تصنيع البادئ (Primer) باتجاه 3′ →5′ طبقاً لمبدأ التزاوج القاعدي : A = U ، G ≡ C، وباستخدام شريط الـDNA ذو الاتجاه 5′ →3′ (الشريط القائد The leading strand) كقالب. ويبدأ إنزيم الـDNA polymerase III عملية التضاعف من خلال إضافة النيوكليوتيدات الرايبوزية منقوصة الأوكسجين الحرّة إلى النهاية OH – 3′ الحرة في بادئ RNA وبالاتجاه 3′ →5′ وبشكل مستمر (الشريط القائد) وحتى نهاية جزيئة الـDNA ، أو حتى بلوغ خواصر (أطراف) شوكة التضاعف. إن ذلك يتم طبقاً لمبدأ التزاوج القاعدي: A = T ، G ≡ C باستخدام شريط الـDNA ذو الاتجاه 5′ →3′ كقالب.

إن الشريط الآخر للـDNA ذو الاتجاه ′3 →′5 (أو ما يُسمّى بالشريط المتلكّئ The lagging strand) يتلكّأ متأخّراً لفترة قصيرة، حتى تكشف ما لا يقل عن 5000 – 1000 نيوكليوتيدة فقط في حقيقيات النواة (ولكن بحدود 150 – 250 نيوكليوتيدة فقط في حقيقيات النواة)، إذ يضع إنزيم الـPrimase البادئ عند النهاية العليا منه عند شوكة التضاعف، أي بالاتجاه ′3 →′5.ويعمل إنزيم الـDNA polymerase III بالتغطية التسلسلية باتجاه أسفل النسق من خلال تصنيع ما لا يقل عن 1000 نيوكليوتيدة من الـDNA.

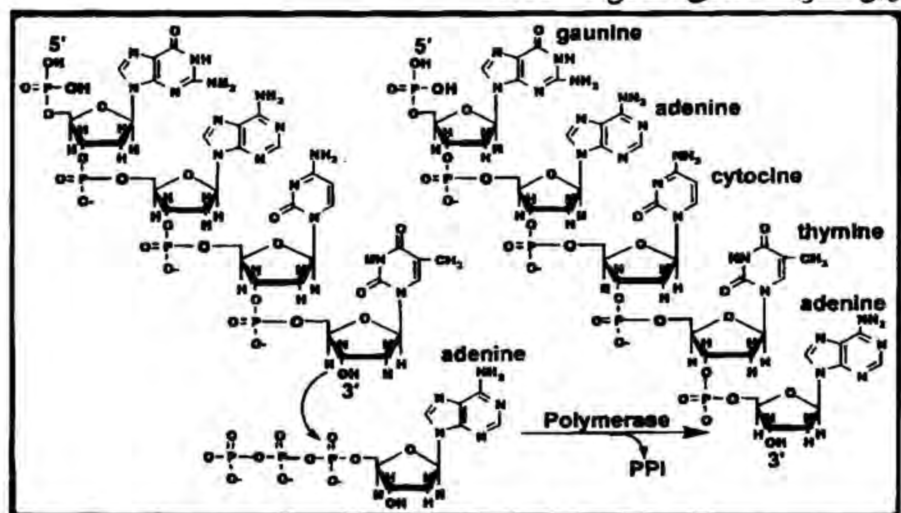
تُكرّر هذه العملية عندما يُمدّ من جديد جزء كافٍ من الـDNA، ويظهر مرة أخرى بسبب التقدّم المستمر للشريط القائد، إذ يضع إنزيم الـPrimase بادئ جديد تتم استطالته بوساطة إنزيم DNA polymerase III حتى وصوله إلى بادئ RNA السابق وهكذا. إن كل مساحة كافية لعمل إنزيم الـDNA polymerase III على الشريط المتلكّئ تدعى بقطعة اوكازاكي (Okazaki fragment) (شكل 2 – 11).



شكل (2 – 11). تضاعف الـDNA وتكوّن الشريطين القائد والمتلكّئ

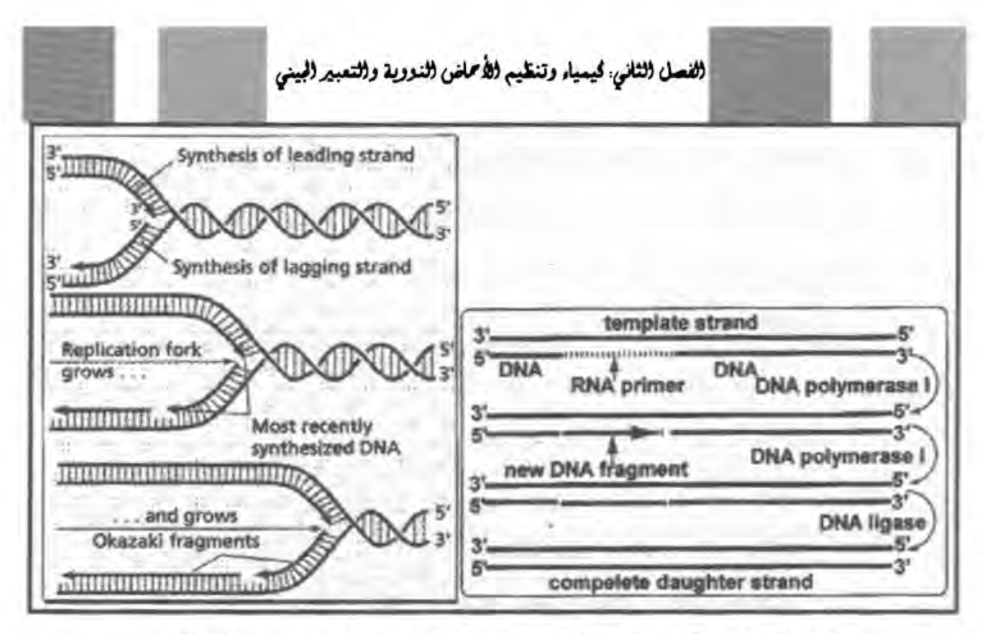



وهذا يعني بأن أحد الأشرطة يُبنى باتجاه شوكة التضاعف ('3 → '5)، أي تكوين الشريط القائد، بينما يُبنى الشريط الآخر بالاتجاه المعاكس (ولكن أيضاً '3 → '5)، أي تكوين الشريط المتلكّئ (شكل 2 – 12).



شكل (2 – 12). إضافة النيوكليوتيدات بوساطة إنزيم الـPolymerase

وأخيراً يتم إزالة البوادئ وملء فراغاتها بترجمة الثغرات بالاتجاه '3 →'5 (5′→ 3′ nick translation) بوساطة إنزيم DNA polymerase I. وبالنسبة للنهاية '5 لقطع الـDNA التي بُنيت بوساطة إنزيم DNA polymerase III فإنه يتم ربطها مع النهاية '3 لقطع الـDNA التي بُنيت بوساطة إنزيم DNA polymerase I بفعل الإنزيم اللاصق (اللاحم، الرابط Ligase) المُعتمد على ATP، كما هو موضّح في الشكل (2 – 13).



شكل (2 – 13). الترتيبات النهائية لعملية تضاعف الـDNA

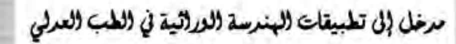
التيلومير (القطعة الطرفية) وإنزيم التيلوميريز

Telomere and Telomerase

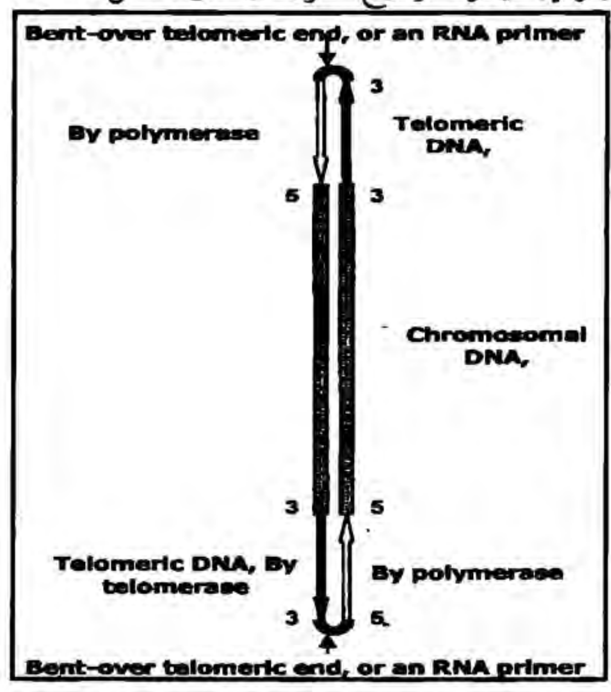
نتيجة لفعل الإنزيمات الخارجية (Exonucleases) النشطة في كل خلية، فإن النهايات الكروموسومية مُعرّضة للقطع باستمرار، وهذا يُسارع بفقدان قطعة اوكازاكي كاملة من شريط الـDNA المتلكّئ عندما يكون امتداد الـDNA المتبقّي أقل من طول الحد الأدنى لقطعة اوكازاكي، ومن ثمّ سوف لن يتضاعف.

التيلومير هي مكررات غير جينية (Gene-less repeats)، تتكوّن من تسلسل نيوكليوتيدي قصير، تُضاف إلى نهايات الكروموسومات بوساطة إنزيم التيلوميريز. يُعدّ القصر التيلوميري وفقدان جينات أساسية في نهايات الكروموسومات من الأساسيات لإحدى النظريات المتعلّقة بتفسير الشيخوخة.

إن إنزيم التيلوميريز عبارة عن معقّد بروتيني – نيوكليورايبوزي (Ribonucleo-protein)، وذو قابلية استنساخ عكسية (Reverse transcriptase)، يتركّب من عدد من البروتينات وجزيئة RNA طرفية (Telomeric RNA molecule).

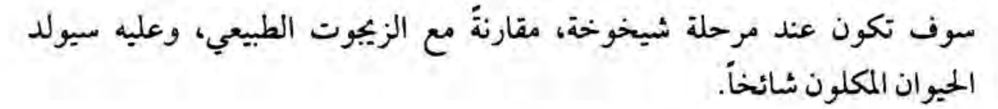


يستخدم هذا الإنزيم تسلسل خاص من جزيئة RNA الخاصة به كقالب لإضافة مكررات نيوكليوتيدية سداسية من DNA مُكمّل من $_n$(5′-TTAGGG-3′) تسلسل يتكرر إلى 6000 زوج قاعدي أو أكثر إلى النهايات ′3 لكل كروموسوم خلال الطور البيني لدورة الخلية البشرية، ثمّ يعمل إنزيم الـDNA polymerase على استخدام تسلسل التيلومير كقالب وبادئ الـRNA (أو منصة ′3 نفسها كبادئ، طالما أنها في العادة أطول من منصة ′5، وتنطوي على نفسها بـ2 أو 4 تراكيب شريطية من خلال التزاوج القاعدي) لتكوين تسلسل مُكمّل له على النهاية ′5 للـDNA، ولذلك فإن الـDNA عند التيلومير سيكون مزدوج الشريط ومغلق (شكل 2 – 14).



شكل (2 - 14). إضافة التيلوميرات إلى نهايات DNA الكروموسوم

تكون التيلومير أطول في الخلايا الجرثومية (Germ cells) والزايجوت، بسبب فعاليّة إنزيم التيلوميريز العالية، وتصبح أقصر خلال الانقسامات الخلوية اللاحقة، وكذلك في الشيخوخة. إن ذلك يوضّح جزئياً إحدى السلبيات لكلونة الحيوانات التي يحدث بسببها شيخوخة مبكرة، طالما أن الخلية الواهبة للنواة (Nuclear donor cell)



سوف تكون عند مرحلة شيخوخة، مقارنةً مع الزيجوت الطبيعي، وعليه سيولد الحيوان المكلون شائخاً.

ومن وظائف التيلومير هي:

(1) منع عملية إعادة التشكيل (Recombination) للنهايات الكروموسومية مع DNA غريب.

(2) استقرارية نهايات الكروموسومات بمساعدة تداخل بروتيني خاص بتسلسل محدّد.

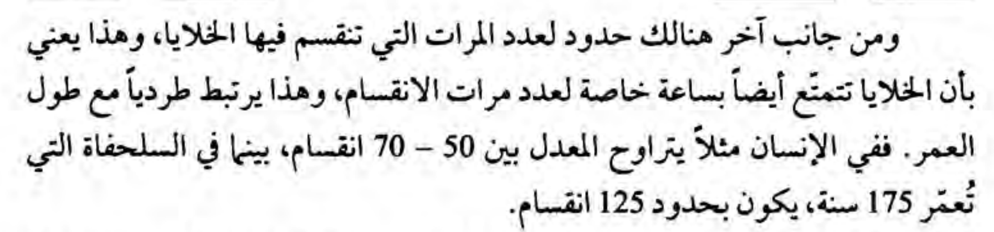
(3) السماح بالتضاعف للنهايات القصوى للكروموسوم.

(4) إن فقدان التيلومير يؤثّر على قابلية إصلاح كسور الأشرطة المزدوجة، وعلى أيّة حال فإن العبور (Cross-over) يكون شائع نسبياً عند مناطق التيلومير أكثر منه بالقرب من السنترومبرات (Centromeres).

تكون التيلوميرات طويلة في الخلايا السرطانية أكثر منها في الخلايا الطبيعية، بسبب زيادة فعّالية إنزيم التيلوميريز في الخلايا السرطانية، ولذلك فإن استخدام مثبّطات إنزيم التيلوميريز وتحطيم جينه تُعدُّ من الطرق العلاجية الروتينية المنطقية.

علاقة الوراثة بطول العمر ودور التيلوميرات:

لقد كشفت الأبحاث العلمية في هذا المجال بأن هنالك علاقة بين عدد مرات الانقسام للخلية والعمر، إذ إن هنالك ما يُشبه الساعة في الخلية الحية تنقص كالشمعة المحترقة في كل انقسام خلوي، بسبب حدوث قصر في DNA التيلوميرات، أي توجد علاقة عكسية بين طول التيلوميرات وعدد مرات الانقسام الخلوية. والسؤال المطروح هنا، لماذا تقصر التيلوميرات كلما انقسمت الخلية؟ إن انقسام الخلية الواحدة إلى اثنتين يرافقه انقسام الـDNA إلى اثنين أيضاً، ويرافق ذلك نقصان جزء صغير من الـDNA لمزدوج، إذ إن الأنزيمات التي تعمل على صنع نسخ جديدة من الـDNA لا تستطيع لالتحام دائماً مع أطراف الـDNA، لذلك تُهمل المواقع الطرفية له، فتقصر لتيلوميرات، وقد يحصل التصاق للكروموسومات مع بعضها، ويولّد ذلك خللاً ينتج عنه الشيخوخة عند توقّف الخلية عن الانقسام.



ومن جانب آخر هنالك حدود لعدد المرات التي تنقسم فيها الخلايا، وهذا يعني بأن الخلايا تتمتّع أيضاً بساعة خاصة لعدد مرات الانقسام، وهذا يرتبط طردياً مع طول العمر. ففي الإنسان مثلاً يتراوح المعدل بين 50 – 70 انقسام، بينما في السلحفاة التي تُعمّر 175 سنة، يكون بحدود 125 انقسام.

إن زيادة طول التيلوميرات يمكن أن يُطيل عمر الخلية، إذ إن الإنزيم المسؤول عن تصنيعها (التيلوميريز) يعمل على إطالة عمر الخلية، فقد وُجد أن الجين المشفّر لهذا الإنزيم يقع على الكروموسوم الخامس، وبإمكانه أن يعكس عقارب الساعة، ويُعيد طول التيلومير الأصلي.

وتنشط إنزيمات التيلوميريز في الخلايا التناسلية (البويضات والنُطف). وتعمل على إضافة تيلوميرات للخلايا المتضرّرة، ولكنها إذا أفرطت في النشاط، من الممكن أن تؤدّي إلى السرطان.

هذا ولوحظ أن التيلوميرات تكون قصيرة جداً عند مرضى الشيخوخة المبكرة (Progeria)، بحيث يكبر المريض من 5 – 10 سنة مقابل كل سنة عند الأشخاص الطبيعيين. يترافق هذا المرض مع حدوث طفرات تؤدي إلى اختلالات في الغلاف النووي، إذ يُصاحب بعض الطفرات في الجين المشفّر لبروتين Lamin A (يُشكّل مع بروتين Lamin B ليفات تبطّن الغلاف النووي مكوّنةً القشرة النووية)، فمثلاً طفرة G608G لا تؤدّي إلى تغيّر في تسلسل البروتين، ولكن تكون موقع اتصال بسبب فقدان 50 حامض أميني من ليف الـLamin A. تسبب هذه الطفرة مرض الشيخوخة المبكّر (Hutchinson-Gilford Progeria) (شكل 2 – 15). كما أن حدوث طفرات في ثلاثة بروتينات أخرى للغلاف النووي يُسبّب أمراضاً مُشابهة.



شكل (2-15). طفلان مصابان بمرض الشيخوخة المبكّر

تحصل حالة الخرف المبكّر الوراثي أو ما يُسمّى بمتلازمة ورنر (Werner syndrome) في الغالب بعد سن العشرينات، والتي تتميّز بفقدان الإحساس بالأطراف. وقد تم في عام 1996 اكتشاف الجين المسؤول عن ذلك، إذ تبيّن حدوث تحوّل في الجين الموجود على الكروموسوم الثامن يُعيق إنتاج إنزيم ضروريٍ لفك حلزون الـDNA.

وعلى الكروموسوم التاسع تم اكتشاف جين مسؤول عن تكوين بروتينات تسمّى E2 ، E3 ، E4 ، فإذا شفّر هذا الجين إلى E2 ، E3 فإن هذه البروتينات تمنع الألياف من الالتصاق بالخلية العصبية، فلا يحدث مرض الزهايمر. في حين إذا شفّر هذا الجين إلى بروتين E4 فإنه لا يمنع هذا الالتصاق فينتج عن ذلك المرض.

كما تم اكتشاف جينات مناعية مهمة تقع على الكروموسوم السادس تُسمّى DR1 و DR9 ، إذ يساعد الجين DR1 على الوقاية من الإصابة بالأمراض. وعلى العكس يكون الجين DR9 غير مرغوب، ومن سوء حظ الأشخاص الحاملين له هو تعرّضهم المستمر للأمراض مقارنةً بالجين الأول.

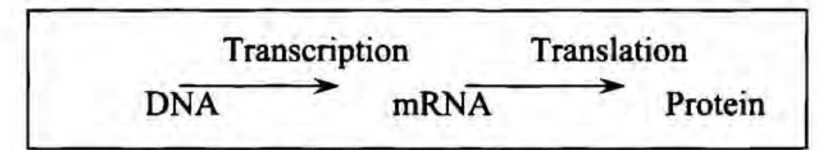


وأظهرت النتائج وجود إنزيم يقع جينه على الكروموسوم رقم 21 يمنع حدوث الأضرار الناتجة عن الجذر الحر (O^{-}) من خلال نزع الإلكترون الزائد في هذا الأوكسيد الخارق. وقد لوحظ بأن ها الإنزيم يختلف من شخص إلى آخر، إذ يكون الإنزيم عند المُعمّرين أقوى من غيرهم.

إن الجذور الحرة تضرّ كثيراً بالـDNA، ولكن بفضل آليات الإصلاح الموجودة في الخلية يتم ترميم هذه الضرار من خلال تلك الإنزيمات. ولكن قد تتكدّس الأضرار، مما يُجبر إنزيمات قص الـDNA إلى استئصال الجزء المتضرّر، لذلك يحدث انتحار خلوي لكي لا يضر بالجسم، كون تلك الخلايا تحوي DNA كثير الضرر، ولكن المشكلة هنا بأنه لو حصل مثل هذا الانتحار في خلايا الدماغ، أدّى ذلك إلى تدهور في وظائف الدماغ.

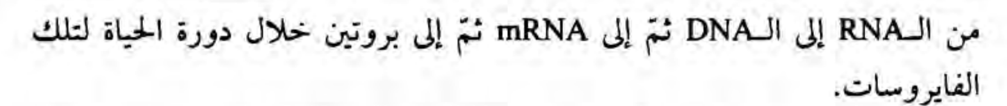
انسياب المعلومات الوراثية :Flow of genetic information:

في أغلب الكائنات الحية يتم انسياب المعلومات الوراثية باتجاه واحد من شفرات الجين المخزنة في الـDNA بوساطة الاستنساخ (Transcription) إلى نسخة مُرسلة بهيئة mRNA والتي تُترجم فيما بعد إلى بروتين ينجز وظيفة الجين.



ملاحظة: نطلق على الشفرة ثلاثية النيوكليوتيدات Triple code عند وجودها على الـDNA اسم Code وتعرف : بأنها تسلسل من قواعد في ثلاثيات Sequence of bases in threes. أما عند تواجدها (استنساخها) على شريط mRNA فتسمّى Codon وتعرف: بأنها التسلسل المكمّل من القواعد في ثلاثيات Complementary sequence of bases in threes. أما عند تواجدها على الـtRNA فتسمّى الشفرة المضادّة Anticodon وتعرف: بأنها تسلسل من ثلاث قواعد مكمّل للشفرة (Codon).

تمتلك فايروسات Retroviruses في مركزها (Core) مادة وراثية بشكل RNA وليس DNA. ولذلك فإن ميكانيكية انسياب المعلومات الوراثية تكون معكوسة، أي



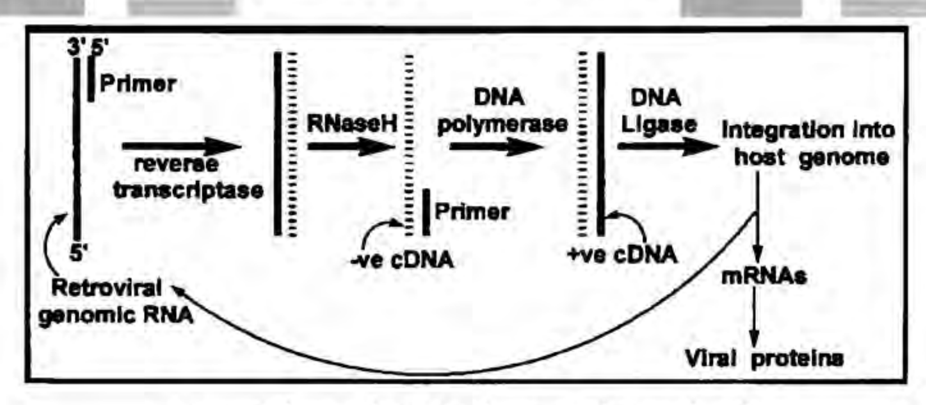
من الـRNA إلى الـDNA ثمّ إلى mRNA ثمّ إلى بروتين خلال دورة الحياة لتلك الفايروسات.

إن إنزيم الاستنساخ العكسي (Reverse transcriptase) الموجود في تلك الفايروسات يعمل على تصنيع نسخة DNA مُكمّلة cDNA (Complementary DNA) لقالب RNA الوراثي. وهذا هو سبب تسميته بإنزيم الاستنساخ العكسي. ثمّ يعمل الإنزيم نفسه (أو إنزيم RNAase H) على تكسير قالب الـRNA في الهجين المتكوّن من DNA/RNA. ويعقب ذلك تصنيع شريط DNA مُكمّل ثاني لشريط الـDNA الذي صُنع أولاً لتكوين شريط مزدوج من الـDNA المُكمّل dcDNA.

Reverse transcription		Transcription		Translation	
RNA ⟶	dcDNA	⟶	mRNA	⟶	Protein

إن شريط الـcDNA المزدوج الفايروسي المُصنّع حديثاً يدخل إلى نواة الخلية المصابة ويتكامل بنفسه من خلال إعادة التشكيل في كروموسوم الخلية المُضيّفة. كما يتم بعد ذلك استنساخ الجينات الفايروسية بهيئة أشرطة mRNA لتترجم إلى بروتينات فايروسية، وكذلك بهيئة RNA جينومي، والذي يتجمّع مع البروتينات الفايروسية لتكوين فايروسات جديدة.

هذا ويُعدّ إنزيم الاستنساخ العكسي من الأهمية في تقنية الهندسة الوراثية، وخصوصاً في مجال إنتاج البروتينات والمواد العلاجية والاقتصادية المهمّة عِبر هذه التقنية (شكل 2 – 16).



شكل (2 – 16). تصنيع الـcDNA لبعض الفايروسات

تصنيع الـRNA (الاستنساخ) (RNA synthesis (Transcription:

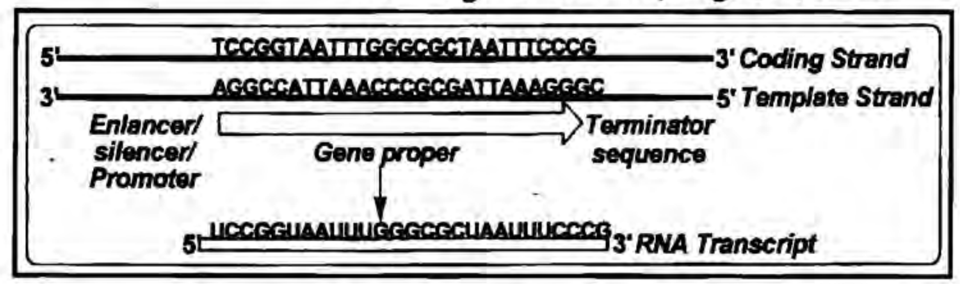
وهي العملية التي يتم من خلالها إنتاج نسخة RNA من منطقة خاصة من الـDNA، أي أساس الجين. ويُطلق على مصطلح وحدة استنساخية (Transcription unit) على تسلسل محدود من الـDNA يتكوّن من أساس الجين ومناطق السيطرة التي تشتمل على تسلسل البدء والسيطرة على المعدل الأساسي للاستنساخ، أو ما يُطلق عليه بالحفّاز (Promoter)، وتسلسلات استجابة الجين التنظيمية (المُشجّع / المُخمد Enhancer / Silencer)، وكذلك تسلسل إنهاء الاستنساخ. كما يوجد بين الجينات أو المناطق الموجودة بين الجينات ذات العلاقة ما يُطلق عليه بالتسلسلات العازلة (Insulator sequences) والتي تعمل على فصل الجين (أو الجينات) التنظيمية التناسقية، لذلك فإن التسلسلات التنظيمية سوف تعمل فقط على ذلك الجين المعزول (أو الجينات المعزولة). ويمكن تلخيص ذلك فيما يأتي:

أ. تسلسلات المشجع / المخمد للجين The gene enhancer/silencer: وهي تسلسلات مسؤولة عن استجابة الجين التي تتحكّم بمعدل تنظيم التعبير الجيني Gene expression (أكثر من المستوى الأساسي).

ب. منطقة حفاز الجين The gene promoter region: أو ما يُطلق عليه بدء الاستنساخ، وهو تسلسل $5' \rightarrow 3'$ من DNA تنظيمي يقع إلى خارج يسار (Up-stream) أساس الجين.

ج. المنطقة المستنسخة أو أساس الجين Transcribed region or gene proper: تسلسل الـDNA الذي يستنسخ بهيئة hnRNA أو أنواع أخرى من الـRNA.

د. منطقة الإنهاء Termination region: تسلسل DNA تنظيمي يقع إلى خارج يمين (Down-stream) أساس الجين لبعض الجينات، وعنده ينفصل إنزيم الـ DNA polymerase عن قالب الـDNA (شكل 2 – 17).



شكل (2 – 17). استنساخ الـRNA

وظيفة وتركيب حفّاز الجين

Structure and function of the gene promoter

وهو تسلسل بدء الاستنساخ، ويعمل في اتجاه قراءة نسق الجين نفسه ($5' \rightarrow 3'$)، ويقع بشكل مباشر إلى خارج يسار أساس الجين، إذ يرتبط إنزيم بلمرة الـRNA (RNA polymerase) مع قالب DNA عند حفاز الجين لبدء المعدل الأساسي من الاستنساخ. إن بعض الحفازات يكون ضعيفاً، والبعض الآخر يكون قوياً، وعنده يكون معدل الاستنساخ سريع جداً، ومع ذلك فإن بعض الجينات تكون عديمة الحفاز (Promoterless genes).

حفاز بدائيات النواة Prokaryotic promoter:

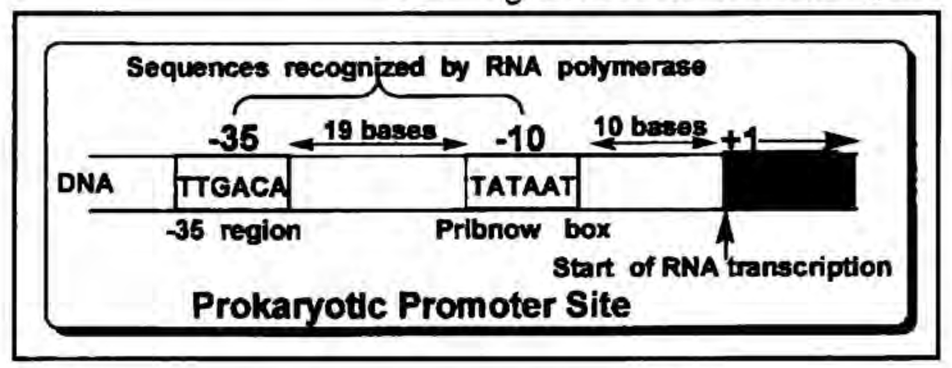
وهي منطقة يتم تميّزها بوساطة إنزيم الـRNA polymerase، ويكون أبسط تركيباً من حفاز حقيقيات النواة، ويتكوّن من ثلاثة أجزاء:

1. صندوق بربنو (Pribnow box): وهو امتداد من 6 نيوكليوتيدات متمثّلة بـTATAAT ويقع بحدود 10 نيوكليوتيدة خارج يسار موقع بداية الاستنساخ.

2. منطقة The – 35 region: وهي امتداد من 8 نيوكليوتيدات متمثّلةبـTGTTGACA وتقع بحدود 35 نيوكليوتيدة خارج يسار موقع بدء الاستنساخ.

3. الامتداد الفاصل The spacer stretch: يتكوّن من 19 نيوكليوتيدة تقريباً ويقع بين صندوق بربنو ومنطقة The-35 region.

مع العلم أن منطقتي صندوق بربنو و The-35 region يتم تشخيصهما بواسطة إنزيم الـ RNA polymerase، علماً أن المناطق الثلاث أعلاه ترقّم بأرقام سالبة (1 – ، 2 – ، الخ)، ابتداءً من أول قاعدة (ترقم 1+) في أول شفرة بدء الاستنساخ للـRNA (Start of RNA transcription) (شكل 2 – 18).



شكل (2 – 18). موقع حفاز بدائية النواة

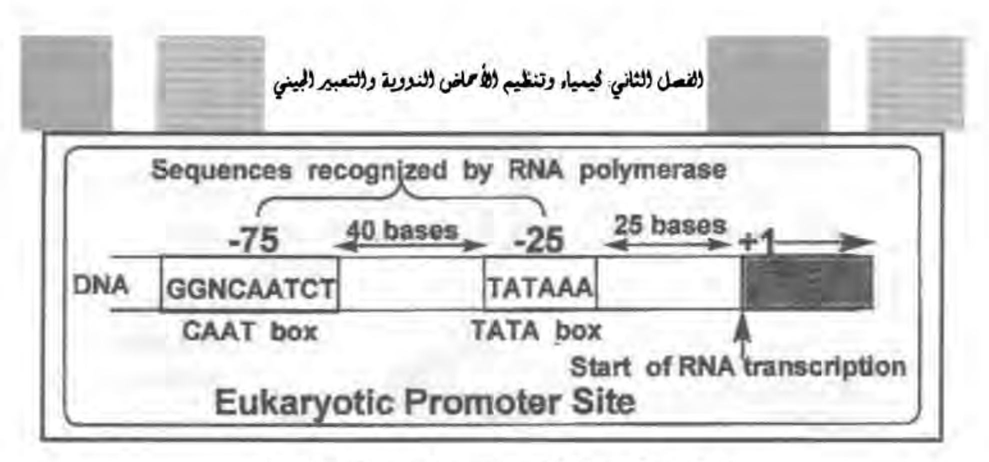
حفاز حقيقيات النواة Eukaryotic promoter:

وهو أكثر تعقيداً من حفاز بدائيات النواة، ويتكوّن على الأقل من ثلاثة أجزاء:

1. صندوق هوكنيز أو صندوق تاتا (Hogness or TATA box): وهو امتداد من 6 نيوكليوتيدات يقع بحدود 25 نيوكليوتيدة خارج يسار موقع بدء الاستنساخ.

2. صندوق CAAT (CAAT box): وهو امتداد من 9 نيوكليوتيدات يقع بحدود 80 – 70 نيوكليوتيدة خارج يسار موقع بدء الاستنساخ.

3. الامتداد الفاصل (The space stretch): امتداد من الـDNA مكوّن من 40 نيوكليوتيدة ويقع بين صندوقي TATA و CAAT (شكل 2 – 19).



شكل (2 – 19). موقع حفاز حقيقية النواة

عناصر استجابة الجين (المُشجّع او الخامد)

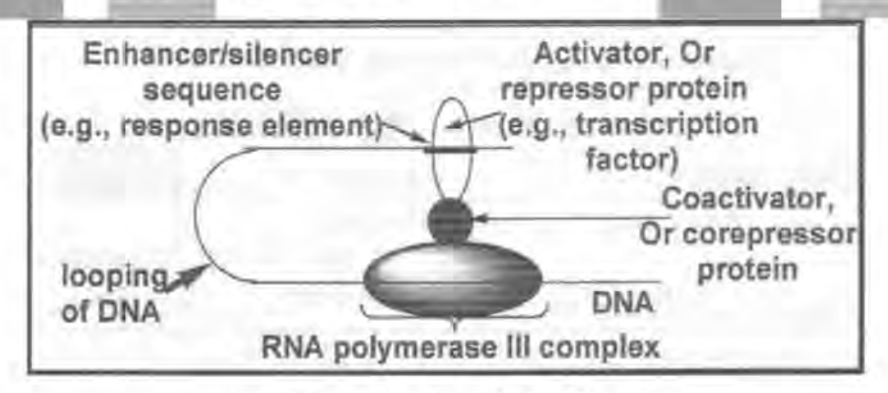
Gene response elements (Enhancer or Silencer)

وهي تسلسلات تنظيمية لعملية الاستنساخ (Transcription regulatory sequences)، والتي قد تبتعد بآلاف النيوكليوتيدات باتجاه خارج اليسار أو اليمين من أساس الجين، أو حتى تقع ضمن أساس الجين، وتعمل في أي اتجاه، أي ′3← ′5 أو .3′ →5′

وقد تعمل هذه التسلسلات على تنشيط الاستنساخ أكثر من المعدل الأساسي، لذلك تُدعى عناصر التشجيع (Enhancer elements)، أو تثبيط الاستنساخ بأقل من المعدل الأساسي، ولذلك تُدعى عند ذلك بعناصر الخمد (Silencer elements). من الأمثلة على ذلك، عناصر الاستجابة الهرمونية (Hormone-response elements) للهرمونات الستيرويدية والثايرويدية وفيتامين D وفيتامين A ومؤثرات أخرى.

إن البروتينات المُنشّطة (المشجّعة) أو المثبطة التي ترتبط مع تلك العناصر تدعى بعوامل الاستنساخ (transcription factors)، وتتداخل مع إنزيم الـ RNA polymerase بشكل مباشر أو غير مباشر من خلال بروتينات مُنشّطة مرافقة أو مثبطة مرافقة (Coactivator or corepressor proteins) لزيادة أو تقليل معدل الاستنساخ.

تحتوي الجينات في العادة على عدد من العناصر المنظمة، ولكن بعض الجينات لا تمتلك ذلك، خصوصاً وأن الجينات المستنسخة التكوينية تمتلك معدل ثابت من الاستنساخ الأساسي (شكل 2 – 20).



شكل (2 – 20). عناصر استجابة الجين

إنزيم بلمرة الـRNA (RNA polymerase):

يمكن تلخيص أنواع إنزيمات بلمرة الـRNA لبدائيات وحقيقيات النواة بالجدول (2 – 2) أدناه:

جدول (2 – 2). الأنواع الوظيفية والمقارنة بين إنزيمات بلمرة RNA المعتمدة على الـDNA في بدائيات وحقيقيات النواة

في حقيقيات النواة In eukaryotes	في بدائيات النواة In prokaryotes
• هنالك ثلاثة أنواع، كل واحد منها متخصص في تصنيع نوع خاص من الـRNA	• نوع مفرد مسؤول عن تصنيع كل أنواع الـRNA
• أغلب منتجات إنزيم الـRNA polymerase تحتاج إلى تحويرات كبيرة بعد الاستنساخ وخصوصاً mRNA.	• منتجات إنزيم الـRNA polymerase لا تتطلب إلى تحوير أو تتطلّب تحويرات بسيطة بعد الاستنساخ.
• تكون إنزيمات بلمرة الـRNA أكثر تعقيداً في التركيب وتتكوّن وحدات ثانوية تصل إلى 16. إن الأنواع الثلاثة من إنزيمات بلمرة الـRNA هي: 1. RNA polymerase I: وهو مسؤول عن تصنيع الجزيئات الكبيرة من الـrRNA. ويكون غير حساس للـα-amanitin (السم المنتج من فطر المشروم Mushroom poison).	• الإنزيم الكلي (Holoenzymes) يتكوّن من 5 وحدات ثانوية: وحدتين ثانويتين متماثلتين من نوع α ، ووحدتين ثانويتين متشابهتين ولكن ليس متماثلتين من نوع β و β′ ، ووحدة ثانوية منظمة من نوع σ، وبذلك يتكون الإنزيم من: $\alpha_2\beta\beta'\sigma$. إن الجزء المكوّن لقلب (Core) الإنزيم

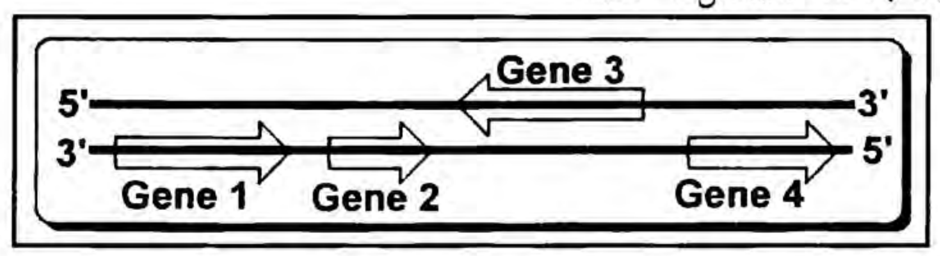
في حقيقيات النواة In eukaryotes	في بدائيات النواة In prokaryotes
2. RNA polymerase II: وهو مسؤول عن تصنيع جزيئات الـmRNA ويكون حساساً للتراكيز المنخفضة للـα-amanitin. 3. RNA polymerase III: وهو مسؤول عن تصنيع الجزيئات الصغيرة للـRNA، مثل tRNA والـrRNA 5S ويكون حساساً للتراكيز العالية للـα-amanitin.	يتكوّن من أربع وحدات ثانوية بعد استثناء العامل σ ، أي أنه من : $\alpha_2\beta\beta'$.

خطوات الاستنساخ Steps of transcription:

1. البدء Initiation:

يحدث البدء على أحد الأشرطة المفردة من وحدة الاستنساخ (الجين) والذي يُدعى الشريط القالب Template (أو الشريط غير المُشفّر Non-coding) وهو يكمل الـRNA، ولا يحدث على الشريط الآخر (أو ما يسمّى بالشريط المشفّر Coding strand). يشابه الشريط المشفّر تسلسل الـmRNA (فيما عدى وجود U بدلاً من T الموجود في الشريط المشفّر).

والسؤال المطروح أي من أشرطة الـDNA يمثّل القالب، واي منها يمثّل الشريط المشفّر؟ وهنا لا بُدَّ من الإشارة إلى اختلاف جين عن آخر، ولكنه في العادة يُقرأ بالاتجاه ′5→′3 (شكل 2 – 21).



شكل (2 – 21). اتجاه استنساخ الجينات (موقع الشريط القالب قد يكون على خيط الـDNA الأعلى أو الأسفل)

يُميّز إنزيم الـRNA polymerase منطقة الحفاز بمساعدة العامل سكما σ (Sigma factor)، ثمّ يرتبط قلب الإنزيم بقوة مع الـDNA، وحالما يرتبط قلب الإنزيم مع الـDNA يعمل على فل 17 نيوكليوتيدة لفصل الشريطين عن بعضهما.

إن ارتباط الإنزيم مع الـDNA بعملية متسلسلة، أي ارتباط عامل σ ثمّ قلب الإنزيم ($\alpha_2\beta\beta'$) الذي يبحث عن موقع بدء الاستنساخ (إطار القراءة المفتوحة Open reading frame الذي يبدأ عند TAC).

إن الـRNA المُصنّع يبدأ في العادة بقاعدة بيورينية، والتي تدخل في موقع البدء (The initiation site) للإنزيم. وهذه القاعدة النيوكليوتيدية الرايبوزية البيورينية في بدائيات النواة تبقى في الـmRNA الناضج، في حين تُزال من الـmRNA الناضج بالنسبة لحقيقيات النواة، وذلك بسبب المعالجة ما بعد الاستنساخ (Post-transcriptional processing) قبل إضافة القلنسوة.

عندما تدخل النيوكليوتيدة الثانية عند موقع الاستطالة (The elongation site) للإنزيم، فإنها تكوّن آصرة فوسفاتية ثنائية الأستر (Phosphodiester bond) بين مجموعة 3′– OH للسكر الرايبوزي لأول نيوكليوتيدة، و 5′– OH لمجموعة الفوسفات على C5 للسكر الرايبوزي للنيوكليوتيدة الثانية.

2. الاستطالة Elongation:

يتحرر عامل سكما (σ factor) قبل بدء خطوة الاستطالة. إن الأنواع الأربعة من النيوكليوتيدات الرايبوزية ثلاثية الفوسفات: ATP ، GTP ، CTP ، UTP تستمر بالدخول في موقع البلمرة Polymerization (أو الاستطالة Elongation) للوحدة الثانوية β مع تحرير البايروفوسفات (PPi)، وفي كل وقت تُضاف نيوكليوتيدة جديدة إلى سلسلة RNA النامية.

يستمر إنزيم الـRNA polymerase بالاستنساخ من 3′ باتجاه النهاية 5′ للشريط القالب طبقاً لمبدأ التزاوج القاعدي بأسلوب متوازي متعاكس (Anti-parallel manner)، وعليه يكون : A = U و G ≡ C و T = A و C ≡ G. وتستمر عملية الاستطالة حتى بلوغ نقطة الإنهاء.

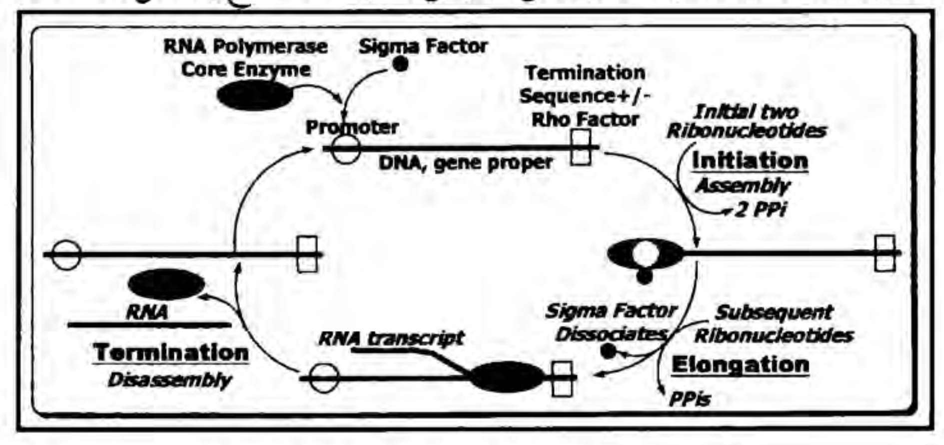
3. الإنهاء Termination:

قد يعتمد الإنهاء على رو ρ (rho factor-dependent) أو لا يعتمد.

أ. الإنهاء المعتمد على رو rho-dependent termination: وفيه يميّز ويرتبط عامل رو مع DNA القالب، ثم يعمل على تفكيك معقّد الـEnzyme/RNA/DNA لتحرير إنزيم الـRNA polymerase وتصنيع جزيئة RNA من شريط DNA القالب.

ب. الإنهاء الغير معتمد على رو rho-independent termination: وفيه يتوقّف إنزيم الـRNA polymerase عن الاستنساخ عندما تأخذ جزيئية RNA المصنّعة الكاملة أبعادها الثلاثية مع تكوين تراكيب ثانوية خاصة مثل دبوس الشعر (Hairpin) الذي يليه تسلسل محدود من اليوراسيل (Oligo-U sequence). إن هذا يؤدي إلى توقّف إنزيم الـRNA polymerase، ومن ثمّ تفكك ماكينة الاستنساخ.

إن الإنهاء في حقيقيات النواة قد يكون أكثر تعقيداً، ويتضمّن إضافة ذيل متعدد الأدنين (Polyadenylate tail). ويمكن تلخيص عملية الاستنساخ بالشكل (2 – 22).



شكل (2 – 22). مخطط يوضح عملية الاستنساخ

المضادات الحيوية المُثبّطة لعملية الاستنساخ

Antibiotic inhibitors of transcription

1. الـRifamycin: يرتبط هذا المضاد الحيوي مع قلب الإنزيم، بحيث يحتل موقع الارتباط بمادة التفاعل (Substrate binding site)، وبذلك يُثبّط النيوكليوتيدات من الارتباط مع موقع البدء.
2. الـActinomycin D: يرتبط مع قالب الـDNA ويثبّط استنساخه من خلال منع حركة إنزيم الـRNA polymerase على طول الـDNA.

التحويرات بعد الاستنساخ التي على الـRNA

Post-transcriptional modification of RNA

I. معالجة الـmRNA (Processing of mRNA):

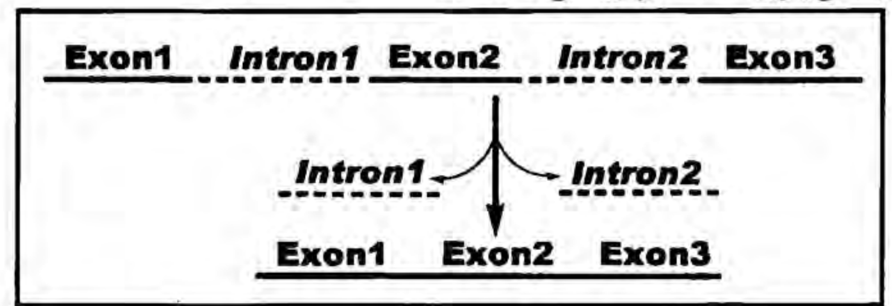
إن الـmRNA الخام المستنسخ في حقيقيات النواة الذي ينتج في النواة يدعى بالـRNA النووي المتباين hnRNA (Heterogeneous nuclear RNA). إذ تتضمّن معالجة الـmRNA بعد الاستنساخ نقصاناً في حجمه (إزالة الأنترونات)، وإضافة القلنسوة عند النهاية ′5 (5′-capping)، وإضافة النهاية الذنبية عند النهاية ′3 (3′-tailing) لتكوين الـmRNA الناضج.

أ. إزالة الأنترونات (النقصان في الحجم)

Intron removal (Decrease in size)

وهذا ناتج عن استئصال أو إزالة التسلسلات الغير قابلة للترجمة الداخلية، أي الأنترونات (Introns) من التسلسلات القابلة للترجمة أو الأكسونات (Exons) بوساطة الـSplicosome (أنظر الشكل 2 – 23 أدناه). إن الـSplicosome عبارة عن تجمّع يتكوّن داخل النواة، يتشكّل من الـRNA النووي المتباين heteronuclear RNA (hnRNA أي أنه النسخة الأولية للـmRNA أو tRNA أو rRNA) + 4 من RNA النووي الصغير Small nuclear RNA (snRNAs: U1 ، U2 ، U5 و U4/U6) + أكثر من 50 بروتين.

يكون دور الـsnRNAs هو ربط نهاية كل أنترونة مع بعضها البعض بوساطة التزاوج القاعدي واستئصال وإزالة الأنترونة، ثمّ إعادة ربط الأكسونات. إن الفعالية الإنزيمية لمعقّد الـSplicosome تكمن في الـsnRNAs، ولذلك يدعى Ribozymes، أي بمعنى إنزيمات ذات تركيبة من الـRNA.



شكل (2 – 23). إزالة الأنترونات من hnRNA حقيقيات النواة

تُسهّل إزالة الأنترونات انتقال الـmRNA الناضج من النواة إلى السايتوبلازم، وإلاّ فإنه سوف يتحلّل في داخل النواة. فعلى سبيل المثال الجين المسؤول عن الـNO synthase البطاني يتكوّن من 22 كيلو زوج قاعدي، ويتملك 26 أكسونة و 25 أنترونة، إذ تعمل الأكسونات على تكوين بروتين من 130 كيلو دالتن مُركّب من 1200 حامض أميني.

هذا وإن أي خلل وراثي في استئصال الأنترونات قد يؤدي إلى حدوث مرض، فمثلاً على الأقل أحد أشكال المرض المعروف بيتا – ثلاسيميا (β-thalassemia) وهو المرض الذي يحدث فيه غياب للسلسلة β-chain للهيموجلوبين، ويبدو ناتجاً عن تغيّر نيوكليوتيدي في عملية الارتباط بين الـexon-intron والذي يمنع عملية الاستئصال المناسبة.

ب. إضافة الذيل متعدد الأدنين عند الطرف ′3

Addition of polyadenylate 3′-tailing

يتم في هذه العملية إضافة ذيل متعدد الأدنين مكوّن من 20 – 250 نيوكليوتيدة عند الطرف ′3 بفعل إنزيم الـPoly-A-polymerase، إذ يتم تشخصيه بوساطة تسلسل خاص بالقرب من الطرف ′3 للـmRNA (وهو AAUAAA). يعمل هذا الذيل على

حماية النهاية 3′ للـmRNA من الفعل الهاضم للإنزيمات القاطعة الخارجية بالاتجاه 3′→5′ (3′→5′ exonuclease)، ويسهّل انتقال الـmRNA إلى السايتوبلازم.

ج. إضافة القلنسوة (أو القبّعة) 7-methyl-guanine عند الطرف 5′

Adding of 7-methyl-guanylate 5′-capping

وهي عملية إضافة 7-methyl-guanocine ثلاثية الفوسفات إلى النهاية 5′ للـmRNA بوساطة إنزيم خاص يدعى Guanylate transferase، إذ تُلصق القلنسوة (Cap) من خلال رابطة 5′ مع 5′ ثلاثية الفوسفات (5′ to 5′ transphosphate linkage) (شكل 2 – 24)، والتي تعمل على رفع مستوى ترجمة الـmRNA وتحميه من فعل الإنزيمات القاطعة الخارجية بالاتجاه 5′→3′ (5′→3′ exonucleases) وإنزيمات الـPhosphatases.

شكل (2 – 24). إضافة القلنسوة للنهاية 5′ للـmRNA

د. اللمسات النهائية التي تطرأ على الـmRNA قبل ترجمته Editing of mRNA

وهي التحوير الذي يطرأ على تسلسل mRNA الناضج بعد الانتهاء التام للمعالجات التي تحدث عليه، وانتقاله إلى السايتوبلازم والذي يؤدي إلى تغيّر أو تشذيب في جزيئة البروتين. فعلى سبيل المثال Apolipoprotein B100 (يمتد من 4536 – 1 حامض أميني، بوزن جزيئي 100 KD_a) يمثّل الشكل الكبدي للـmRNA الكامل، والـB48 (يمتد من 1 – 2152 حامض أميني، بوزن جزيئي 48 KD_a) يمثّل الشكل المُشذّب المعوي للبروتين، إذ إن الشكل المعوي للـmRNA ينتج بفعل إزالة مجموعة الأمين (Deamination) لقاعدة السايتوسين في الشفرة CAA للحامض الأميني رقم 2153 وتحوّلها إلى قاعدة يوراسيل بواسطة إنزيم معوي خاص لإزالة مجموعة الأمين من السايتوسين (Intestine-specific cytocine deaminase). إذ إن شفرة الـUAA المتكوّنة هي عبارة عن شفرة توقّف (Stop codon) تعمل على التشذيب في الحجم من B100 إلى B48.

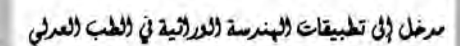
عمر النصف للـmRNA (Half-life of mRNA):

إن عمر النصف للـmRNA لا يتم فقط بوساطة الستراتيجيات المشار إليها أعلاه، ولكن يتم التحكّم فيه أيضاً بوساطة تسلسلات خاصة في mRNA تقع عند النهايات ʹ5 وʹ3 لا تترجم وتعمل على تحديد عمر النصف، إذ إن هنالك بروتينات تنظيمية ترتبط مع تلك التسلسلات. فعلى سبيل المثال تتم السيطرة على نقل الحديد وخزنه من خلال تنظيم عمر النصف للـmRNA الخاص بنواقل الحديد والبروتينات الرابطة بوساطة البروتينات المُنظّمة بالحديد (Iron-regulated proteins).

الاختلافات بين mRNA في بدائيات وحقيقيات النواة

Differences between prokaryotic and eukaryotic mRNA

يمكن تلخيص تلك الاختلافات في الجدول (2 – 3) أدناه:



جدول (2 – 3). الاختلافات بين mRNA في بدائيات وحقيقيات النواة

الصفة	بدائيات النواة	حقيقيات النواة
• عمر النصف	قصير	طويل
• عدد السسترونات Cistrons (السسترونات: وحدات الترجمة Translation unit)	متعدد السسترونات Polycistronic	أحادي السسترونات Monocistronic
• الأنترونات	لا توجد	توجد
• انفصال عملية الترجمة عن عملية الاستنساخ	كلا	نعم
• معالجات ما بعد الاستنساخ (إضافة القلنسوة، إضافة الذيل، استئصال الأنترونات، اللمسات الأخيرة على mRNA)	كلا	نعم

II. معالجة الـtRNA (Processing of tRNA):

إن نسخة الـtRNA الأولية تعتبر كأصل كبير، وتحتوي أكثر من tRNA واحد، إذ يتم معالجتها بفعل نوع خاص من إنزيمات الـRibonucleases كما تتضمّن هذه العملية أيضاً إزالة الأنترونات وشطر التسلسل القائد 5′-leader sequence. هذا ويتم أيضاً تحوير في بعض نيوكليوتيدات الـtRNA إذ تشمل عمليات التحوير هذه على المثيلة (Methylation) وإزالة الأمين (Deamination) والألكلة (Alkylation) والاختزال (Reduction)وإضافة الجليكوسيل (Glycosylation)، وأخيراً استبدال النهاية 3′-terminal UU بنهاية CCA في ذراع استقبال الحامض الأميني عند الطرف 3′ بوساطة إنزيم Nucleotidyl transferase.

III. معالجة الـRNA الرايبوسومي (Processing of ribosomal RNA):

يتم التعامل مع جزيئة أصل كبيرة 45S عديمة الأنترونات، إذ تنشطر بوساطة إنزيم قاطع داخلي (Endonuclease) متخصص، وخارجي (Exonuclease) متخصص إلى أنواع من rRNA وهي: 5.8S , 18S , 28S. أما بالنسبة للنوع 5S rRNA فإنه يأتي من جين منفصل.

صفات الشفرة الوراثية Characters of the genetic code:

الشفر (Codon) عبارة عن تسلسل DNA من ثلاث قواعد يستنسخ في الـmRNA (لكن بدل T يستنسخ U) والذي يحدد نوع وموقع الحامض الأميني في البروتين المترجم. وفي العادة تتم القراءة بالاتجاه 3′→5′ في الـmRNA، ويتم تحديدها حسب التكامل القاعدي بالأسلوب المتوازي المتضاد (Anti-parallel manner) بوساطة الشفرة المضادة (Anticodon) الموجودة في الـtRNA (بالاتجاه 5′→3′).

إن كل التشكيلات البديلة الثلاثية المحتملة للقواعد الأربع الداخلة في تركيب الـDNAاو الـRNA تعطي 64 شفرة ثلاثية أو الأنواع الممكنة للأحماض الأمينية. كما أنه من بين هذه الـ64 شفرة يوجد ثلاث شفرات (UGA , UAG , UAA) والتي تدعى شفرات غير حساسة Non-sense (أي عديمة المعنى Meaning-less) وذلك لأنها لا تشفر إلى حامض أميني ولكنها تؤشر إنهاء الترجمة للـmRNA. ويبين الجدول (2 – 4) أنواع الشفرات الوراثية المستنسخة في mRNA.

جدول (2 – 4). الشفرات الوراثية المستنسخة في الـmRNA والأحماض الأمينية المترجمة عنها

1st nucleotide	2nd nucleotide				3rd nucleotide
	U	C	A	G	
U	Ph-alanine	Serine	Tyrosine	Cysteine	U
	Ph-alanine	Serine	Tyrosine	Cysteine	C
	Leucine	Serine	Stop	Stop	A
	Leucine	Serine	Stop	Tryptophan	G
C	Leucine	Proline	Histidine	Arginine	U
	Leucine	Proline	Histidine	Arginine	C
	Leucine	Proline	Glutamine	Arginine	A
	Leucine	Proline	Glutamine	Arginine	G

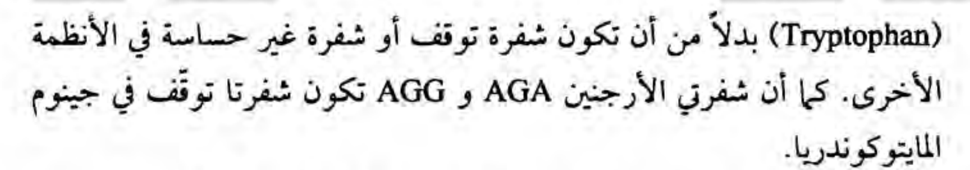
1st nucleotide	2nd nucleotide				3rd nucleotide
	U	C	A	G	
A	Isoleucine	Threonine	Asparagine	Serine	U
	Isoleucine	Threonine	Asparagine	Serine	C
	Isoleucine	Threonine	Lysine	Arginine	A
	Methionine	Threonine	Lysine	Arginine	G
G	Valine	Alanine	Aspartate	Glycine	U
	Valine	Alanine	Aspartate	Glycine	C
	Valine	Alanine	Glutamate	Glycine	A
	Valine	Alanine	Glutamate	Glycine	G

وفيما يلي أهم صفات الشفرة الوراثية:

1. التخصص أو عدم الالتباس Specific or unambiguous: إذ إن كل شفرة تكون متخصصة لحامض أميني مفرد، فمثلاً UUU تشفر إلى الفنيل الانين (Phenylalanine) فقط.

2. الانحلال Degeneracy: طالما أنه يوجد 61 شفرة وراثية تشفر للأحماض الأمينية، وأن كل حامض أميني قد يشفر له ببضع الشفرات. إن الـ61 شفرة لا تتقسم بالتساوي على الـ20 حامض أميني الداخلة في تركيب البروتين، فالأرجنين (Arginine) مثلاً يمتلك 6 شفرات، وهي (AGG, AGA, CGG, CGA, CGC, CGU)، في حين أن الميثيونين (Methionine) يمتلك شفرة واحدة فقط، وهي AUG ، وهذا هو سبب تسمية الشفرة بالمنحلّة (Degenerate).

3. العمومية Universality: تكون الشفرة الوراثية عامة، أي تشخص الحامض الأميني نفسه في كل الكائنات الحية من الفايروسات والبكتريا والنباتات والحشرات إلى اللبائن. ولكن هناك استثناء في جينوم المايتوكوندريا، إذ تشخص AUA الميثيونين (Methionine) بدلاً من الآيزوليوسين (Isoleucine)، وتشخص UGA التربتوفان



(Tryptophan) بدلاً من أن تكون شفرة توقف أو شفرة غير حساسة في الأنظمة الأخرى. كما أن شفرتي الأرجنين AGA و AGG تكون شفرتا توقّف في جينوم المايتوكوندريا.

4. عدم التداخل Non-overlapping: إن شفرات الـmRNA تقرأ بأسلوب مستمر بالاتجاه ′3→′5 بدون أي تداخل، وبهيئة تسلسل من ثلاث قواعد، أي أنه لا توجد قواعد بين كل شفرتين متتاليتين، لذلك فإن إضافة أو إزالة أي قاعدة يؤدي إلى إزاحة إطار القراءة، ويؤدي ذلك إلى اختلاف كلّي من تسلسل الأحماض الأمينية. ولكن مع ذلك في الفايروسات الصغيرة، إذ تستخدم جينومها في كل اتجاه ممكن، ولذلك يوجد فيها جينات متداخلة، ولكن رغم هذا تبقى الشفرات غير متداخلة.

5. عديمة الفاصلة Comma-less: إذ إن الشفرات تمثل تركيب مستمر بدون فواصل.

6. الترافق الخطي بين الجين والناتج Colinearity of gene and product: أي وجود تطابق خطي في التسلسل القاعدي في الجين والـmRNA المستنسخ منه (بعد نضج وجهوزية هذا الـmRNA) مع تسلسل الأحماض الأمينية في البروتين.

فرضية تذبذب (اهتزاز) كريك

Crick's wobble (shaking) hypothesis:

إن انخفاض التخصص في الموقع الثالث للشفرة الوراثية يُطلق عليه انحلال القاعدة الثالثة (Third base degeneracy) أو ظاهرة التذبذب (Wobbling phenomenon)، وذلك لأنها لا تخضع إلى القانون الدقيق للتكامل القاعدي. إن ذلك يُمكّن tRNA واحد ذو شفرة مضادّة (Anticodon) خاصة من التكامل مع بعض الشفرات لنفس الحامض الأميني، ولتقليل تأثيرات الطفرات أيضاً.

إن الشفرة المضادة الموجودة على tRNA تشخّص عدد من الشفرات المرادفة (Synonym codons) لحامض أميني واحد، والتي تختلف عند القاعدة الثالثة. إن الـmRNA والـtRNA يترافقان بأسلوبٍ متوازٍ متعاكسين ويُقرءان بالاتجاه ′3→′5، لذلك فإنه إذا كانت القاعدة الأولى للشفرة المضادة C فإنها سوف تتكامل مع G في الموقع الثالث

للشفرة، وإذا كانت U فإنها تتكامل مع G أو A في الموقع الثالث للشفرة، وإذا كانت G فإنها تتكامل مع C أو U في الموقع الثالث للشفرة، ولكن إذا كانت إينوسين I (Inosine) فإنها تتكامل مع A أو C أو U في الموقع الثالث للشفرة. فعلى سبيل المثال تتكامل شفرتي الأرجنين AGA و AGG مع الشفرة المضادة نفسها UCU، كما أن الشفرات الثلاث للجلايسين GGU و GGC و GGA تتكامل مع الشفرة المضادة نفسها CCI.

تصنيع البروتين Protein synthesis:

البروتينات عبارة عن بوليمرات من الأحماض الأمينية والتي يتم تحديدها بوساطة الـmRNA، ويتم تصنيعها في السايتوبلازم من خلال الريبوسومات الواقعة على الشبكة الإندوبلازمية أو الحرة أو التي تقع في داخل المايتوكوندريا. هنالك أنواع متباينة من البروتينات ذات وظائف وتركيبات مختلفة بسبب تسلسل الأحماض الأمينية في متعدّد الببتايد المكوّنة له. هذا وإن أي بروتين مُنتج في خلية معيّنة يتم بالاعتماد على جين واحد أو أكثر.

تتضمّن عملية تصنيع البروتين أربع خطوات:

1. تنشيط الأحماض الأمينية Activation of amino acids.
2. البدء Initiation.
3. الاستطالة Elongation.
4. الإنهاء Termination.

مُتطلبات تصنيع البروتين Requirements for protein synthesis:

هنالك مجموعة من المتطلبات الضرورية لعملية تصنيع البروتين، وهي الأحماض الأمينية و tRNAs (31 نوع) و mRNA وإنزيمات الـ Aminoacyl-tRNA synthetases والرايبوسومات وبعض عوامل البروتين والـATP والـGTP للطاقة.

وفيما يلي المراحل الأربع لعملية تصنيع البروتين:

1. تنشيط الأحماض الأمينية Activation of amino acids:

يتم تنشيط الحامض الأميني بوساطة إنزيم الـ Aminoacyl-tRNA synthetases المتخصص بربط حامض أميني خاص مع tRNA خاص كالآتي :

Amino acid + ATP → Aminoacyl – AMP + PPi.

Aminoacyl – AMP + tRNA → Aminoacyl – tRNA + AMP.

إن مجموعة α – COOH للحامض الأميني ترتبط مع مجموعة 3′ – OH للأدنين لذراع الاستقبال (Acceptor arm) للـtRNA (أي أنه ACC – 3′).

2. البدء Initiation:

تتطلب خطوة البدء لتصنيع البروتين تمييز الـmRNA للترجمة بوساطة الرايبوسومات. كما أن متطلبات هذه الخطوة هي:

a. Aminoacyl – tRNA.

b. الرايبوسومة.

c. mRNA.

d. ATP و GTP.

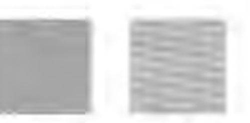
e. على الأقل 10 عوامل بدء (في حقيقيات النواة) Eukaryotic initiation factors (eIFs).

A. تكوين معقد سابق البدء 43S

Formation of the 43S preinitiation complex:

i. يعمل عامل البدء eIF1 لحقيقيات النواة (Eukaryotic initiation factor-1) على تفكيك الرايبوسومية الكاملة إلى حداتها الثانوية 40S و 60S ثمّ يعمل عامل البدء eIF3 على منع إعادة اتحاد تلك الوحدات الثانوية.

ii. إن الـAminoacyl – tRNA (نوع met-tRNA) يتداخل مع عامل البدء eIF2 المرتبط مع GTP ليمكّنه من ربط معقد الـ40S-eIF1-eIF3 ليعطي معقد سابق البدء 43S.





B. تكوين معقد سابق البدء 48S

Formation of the 48S preinitiation complex:

i. يرتبط عامل البدء eIF4 مع قلنسوة (Cap) الـmRNA ويُنشّطه للارتباط مع معقد سابق البدء 43S لتكوين معقد 48S مع تحلل الـATP إلى Pi+ADP.

ii. يعمل هذا المعقد على مسح (تفتيش) الـmRNA للبدء بالـAUG، إذ إن AUG يمثل في الغالب شفرة البداية عند الطرف ′5 مع تسلسل خاص يحيط بها، لذلك فإن الشفرة المضادة للـAminoacyl – tRNA تجلب للارتباط مع شفرة بدء الترجمة في mRNA. إن البروتين المُصنّع حديثاً دائماً يبدأ بالمثيونين (في بدائيات النواة يكون Formyl-methionine) حيثما يكون الطرف N-terminal الحامض الأميني طالما أن الترجمة تبتدئ دائماً عند الـAUG.

C. تكوين معقد البدء 80S

Formation of the 80S preinitiation complex:

يعمل عامل البدء eIF5 على تحليل GTP الواقع على eIF2 إلى Pi+GDP وينشط ارتباط معقد سابق البدء 48S مع الوحدة الثانوية 60S مع تحرير عوامل البدء 1 و 2 و 3 و 4.

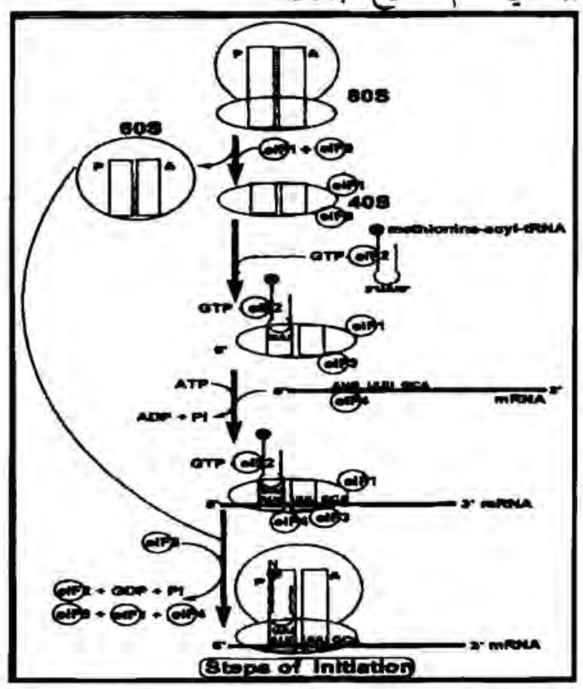
ويوضّح الشكل (2 – 25) خطوات مرحلة البدء المشار إليها سلفاً.

تحتوي الرايبوسومة الكاملة على موقعين ارتباطيين للـAminoacyl-tRNA وهما موقع P (Peptidyl site) وهو الموقع المتقدم للـAminoacyl-tRNA الذي يحمل أحد الأحماض الأمينية أو حوامض أمينية أكثر. وموقع A (الموقع التالي للـAminoacyl-tRNA).

إن أول Aminoacyl-tRNA حامل لأول حامض أميني في سلسلة متعدد الببتايد أوتوماتيكياً سوف يقع عند الموقع P، والـ Aminoacyl-tRNA التالي يدخل عند الموقع A.

هذا وعندما تكون الخلية تحت ظروف إجهاد تجعلها غير قادرة على تصنيع البروتين، مثل فقدان الأحماض الأمينية أو الجلوكوز أو الحرمان من عوامل النمو أو ارتفاع الأوزمولية (Hyperosmolality) أو الصدمة الحرارية (Heat shock)، فإن

eIF2 يخضع إلى الفسفرة التثبيطية بوساطة إنزيمات Kinases خاصة لمنع تكوين معقد سابق البدء 43S وبالتالي عدم تصنيع البروتين.



شكل (2 – 25). خطوات مرحلة البدء

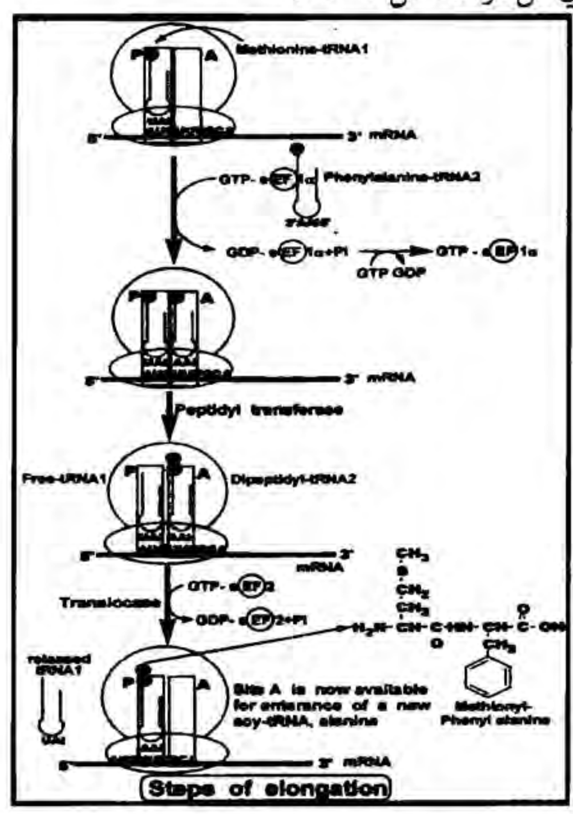
3. الاستطالة Elongation:

a. يرتبط عامل الاستطالة eEF1α (Elongation factor 1α) مع الـAminoacyl-tRNA مع تحلل الـGTP إلى GDP+Pi لتكوين معقد، وهذا المعقد يسمح للـAminoacyl-tRNA للدخول إلى الموقع A للرايبوسومة مع تحرير عامل eEF1α.

b. إن مجموعة الـNH_3 – α للحامض الأميني الجديد ترتبط مع مجموعة α – COOH للحامض الأميني الأول (Met) مع انتقال كل السلسلة الببتيدية إلى الـtRNA عند الموقع A بوساطة إنزيم الـPeptidyl transferase (الـ28S ribozyme للوحدة الثانوية 60S) مع تحرير الـtRNA الحر عند الموقع P.

c. يعمل عامل الاستطالة 2 (eEF2 وإنزيم الـTranslocase) على تغيير الموقع لكل المعقد مع Peptidyl-tRNA المتكون حديثاً لمسافة شفرة واحدة على طول الـmRNA

بالاتجاه ′5 إلى ′3. إن عملية تغيير الموقع تحتاج إلى التحلل المائي للـGTP إلى GDP+Pi وتكوين موقع A جديد فارغ، وذلك لدخول Aminoacyl-tRNA جديد، ولتمييز الشفرة الجديدة وهكذا. ولهذا فإن السلسلة الببتيدية المتعددة تزداد حامضاً أمينياً في كل مرّة (شكل 2 – 26).



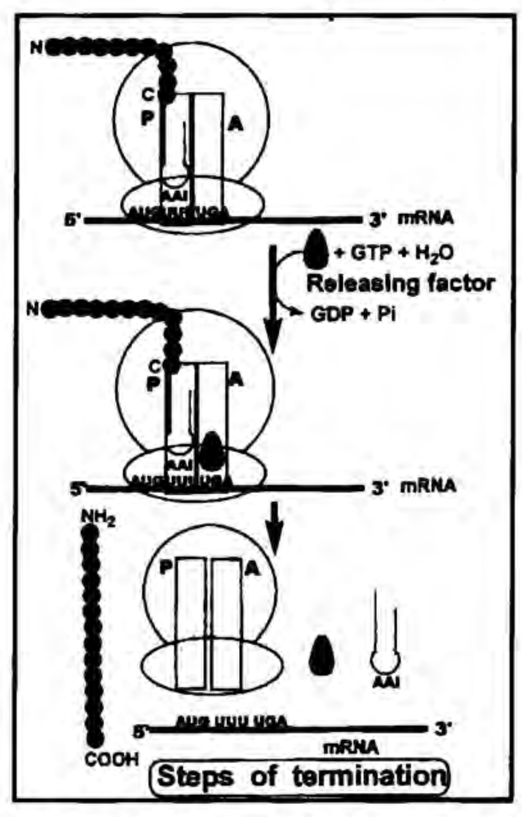
شكل (2 – 26). خطوات مرحلة الاستطالة

4. الإنهاء Termination:

عندما تظهر شفرة إنهاء (Termination codon) في الـmRNA عند الموقع A، فإنه لا يمكن لأي tRNA من تمييزها، في حين يتم تمييزها بوساطة عوامل التحرر eRFs (Releasing factors).

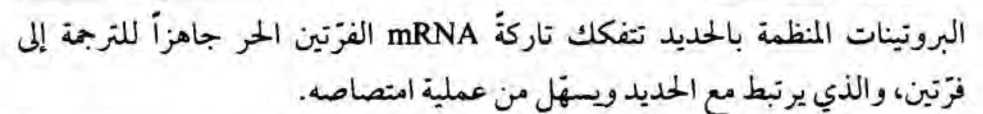
يعمل عامل التحرر على تنشيط إنزيم الـpeptidyl transferase لتحليل وتحرير السلسلة الببتيدية الواقعة على الـtRNA عند الموقع P ولتحرير الـtRNA

ثمّ الـmRNA وتفكك الرايبوسومة 80S. وهذا يتطلّب التحلل المائي للـGTP إلى GDP+Pi (شكل 2 – 27).



شكل (2 – 27). خطوات مرحلة الإنهاء

إن معدل تصنيع البروتين لا يتم التحكّم فيه فقط بوساطة معدل الاستنساخ الجيني (Gene transcription)، بل أيضاً بوساطة معدل الترجمة (Rate of Translation). فعلى سبيل المثال الـmRNA للفرّتين (Ferritin) يكوّن بروتين رابط للحديد Iron-binding protein. فعندما يزداد الحديد في الخلايا المخاطية (Mucosal cells) يرتبط الحديد مع البروتين المنظم بالحديد (iron-regulated protein) الذي يعمل على تغطية mRNA للفرّتين ويمنعه من الترجمة ويقلّل من عمره النصفي. وعلى العكس من ذلك، عندما ينخفض محتوى الحديد المخاطي، فإن



البروتينات المنظمة بالحديد تتفكك تاركةً mRNA الفرّتين الحر جاهزاً للترجمة إلى فرّتين، والذي يرتبط مع الحديد ويسهّل من عملية امتصاصه.

التحويرات التي تطرأ على البروتينات بعد الاستنساخ

Post-translation modification of proteins:

وتتضمّن تلك التحويرات ما يأتي :

a. الطي النهائي (الذي يمنع من خلال العمليات الحافظة لمرافقة الجزيئة حتى انتهاء عملية الاستنساخ).

b. التنشيط بوساطة التحلل المائي لببتيد إضافي (قبل – سوابق – بروتينية Pre-pro-proteins).

c. عملية إضافة السكر (Glycosylation) التي تحدث في الشبكة الإندوبلازمية ومعقّد جوجلي.

d. عملية إضافة الهيدروكسيل (Hydroxylation) للبرولين واللايسين كما هو الحال في الكولاجين.

e. عملية إضافة الفسفور (Phosphorylation) للتايروسين أو السيرين أو الثريونين.

تأثير المضادات الحيوية في عملية تصنيع البروتين

Effect of antibiotics on protein synthesis

يوجد عدد من المضادات الحيوية وبعض السموم التي تعمل بشكل انتقائي على تثبيط تصنيع البروتين في البكتريا، وذلك بسبب الاختلاف بين النظام الرايبوسومي في حقيقيات النواة وبدائيات النواة.

1. Aminoglycosides مثل الـStreptomycin والـGentamycin والـAmikin ، والتي ترتبط مع 23S rRNA وتعيق ارتباط الـmRNA مع الرايبوسومة.
2. Tetracyclines والتي تمنع ارتباط الـAminoacyl-tRNA مع الموقع A.
3. Chloramphenicol يعمل على تثبيط الـPeptidyl transferase.



4. Puromycin يمتلك تركيباً مشابهاً للـTyrocyl-tRNA ويسبب تحرراً للببتيد قبل نضجه في كل من حقيقيات وبدائيات النواة.

5. Cycloheximide يعمل على تثبيط إنزيم الـPeptidyl transferase في حقيقيات النواة فقط.

6. السم الخارجي لبكتريا الخنّاق (Diphtheria exotoxin) يعمل على تثبيط وظيفة الـADP-ribosylates eEF2.

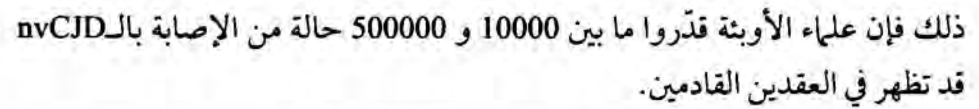
هذا وقد تحدث تحوّرات اختلالية على مستوى التركيب الثانوي للبروتين، مؤدّيةً بذلك إلى حدوث بعض الأمراض الخطيرة والتي نودّ أن نُشير إلى مثال عليها هنا في نهاية ها الفصل، تحت العنوان الآتي:

مرض جنون البقر (الاعتلال الدماغي الأسفنجي):

بتاريخ 20 / 3 / 1996 أعلنت الحكومة البريطانية عن وجود مرض دماغي جديد أدّى إلى وفاة 10 حالات بعمر الشباب من البريطانيين، وأن الضحايا تمت إصابتهم من خلال أكل لحوم الأبقار المصابة. وقد عُرف باسم مرض جنون البقر (Mad cow disease) أو الاعتلال الدماغي الأسفنجي البقري BSE (Bovine Spongiform Encephalopathy) والذي يعمل على حدوث تحطّم وخراب بطيء في خلايا الدماغ، حتى يكتسب المظهر الشبيه بالإسفنج المليء بالأخاديد والتجاويف، وغالباً ما يكون قاتلاً. كما أن الدراسات الحديثة أثبتت بأن مرض BSE ونوع جديد من المرض يُصيب الإنسان يُرمز له nvCJD (Creutzfeldt – Jacob Disease) يكونان مُتشابهان على المستويين المرضي والجزيئي مع احتمالية عالية لحدوث المرض نفسه.

أدّى مرض جنون البقر إلى هياج عارم في أوروبا وخسارة بحدود 8.9 بليون دولار في تجارة اللحوم البريطانية، كما أن الاتحاد الأوروبي أعدم وأحرق ما يقارب 4.7 مليون بقرة، وبكلفة بلغت أكثر من 12 بليون دولار لتعويض الفلاحين.

لقد ظهر BSE و nvCJD حديثاً في فرنسا وبلدان أوروبية أخرى وجنوب أفريقيا . هذا وقد مات ما لا يقل عن 90 مواطن أوروبي بسبب nvCJD. فضلاً عن



ذلك فإن علماء الأوبئة قدّروا ما بين 10000 و 500000 حالة من الإصابة بالـnvCJD قد تظهر في العقدين القادمين.

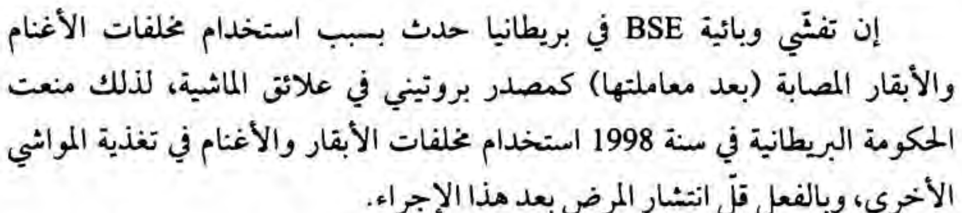
إن BSE و nvCJD وأنواع أخرى من CJD كلها أفراد لمجموعة من الأمراض التي تُصيب الجهاز العصبي، فتسبب اعتلالات دماغية أسفنجية، تصيب الحيوانات (BSE) والإنسان (CJD و nvCJD). وفي هذه المجموعة من الأمراض تتشابه أنسجة الدماغ المصاب بالمظهر الأسفنجي الذي تشوبه المخلّفات البروتينية. ويفقد ضحايا المرض الوظيفة الحركية، يلي ذلك العته ثمّ الموت أخيراً.

هنالك اختلافان بين CJD و nvCJD في فترة الحضانة والأعراض، إذ تكون فترة الحضانة للـCJD بين 20 – 30 سنة، في حين يمتلك nvCJD فترة حضانة أقل، لذلك فإن ضحاياه يُظهرون سرعة في الانحطاط والعته، فضلاً عن فقدان التوافق الحركي في مراحل مبكرة من لمرض، كما أن nvCJD يرتبط مع استهلاك لحوم المواشي الملوثّة بالـBSE بشكل واضح. وليس كذلك بالنسبة للـCJD، فضلاً عن ذلك ينتشر CJD في الناس فوق عمر 55 سنة، في حين أن nvCJD قد ولحظ في أولئك الأقل من هذا العمر، بل وحتّى في أعمار صغيرة كالسنوات العشر المبكرة.

لقد نشأ عدد من حالات CJD بشكل تلقائي وعشوائي بمعدل 1 لكل مليون في السنة على مستوى العالم، ويورّث أحد أشكال CJD وهو أقل شيوعاً، بهيئة جسيمة سائدة، ولكن الأشكال الانتقالية تكون أكثر غرابة.

يمكن أن ينتقل CJD من خلال زراعة القَرنية أو الأنسجة العصبية أو بوساطة حقن هرمون النمو (Growth hormone) المُشتق من الغدد النخامية للإنسان. هذا وينتقل مرض Kuru وهو مشابه للـCJD، وكان قد أصاب قدماء البشر في نيو غينيا من خلال طقوس أكل لحوم البشر عندهم. تستهدف الحيوانات حالات العدوى للاعتلالات الدماغية الأسفنجية، كمرض Scrapie (في الماعز والأغنام) ومرض Chronic wasting disease (في الأيّل والضبي)، وكذلك مرض BSE، وتحصل الإصابة بأمراض Kuru و BSE و Scrapie من حيوان إلى حيوان بوساطة أكل بقايا الحيوانات المصابة وخصوصاً الأنسجة العصبية.





إن تفشّي وبائية BSE في بريطانيا حدث بسبب استخدام مخلفات الأغنام والأبقار المصابة (بعد معاملتها) كمصدر بروتيني في علائق الماشية، لذلك منعت الحكومة البريطانية في سنة 1998 استخدام مخلفات الأبقار والأغنام في تغذية المواشي الأخرى، وبالفعل قلّ انتشار المرض بعد هذا الإجراء.

وفي خطوة حديثة تكاد تكون مشابهة، أصدر الاتحاد الأوروبي حضراً مؤقتاً على استخدام الأغذية ذات المحتوى الحيواني في كل العلائق الحيوانية، ومع ذلك لم يُطبق هذا الإجراء.

أما في الولايات المتحدة الأمريكية وكندا، فالقوانين لازالت تسمح للحيوانات غير المجترّة باستهلاك الأغذية المحتوية على منتجات لحوم المجترات، وتسمح للحيوانات المجترة باستهلاك العلائق المحتوية على لحوم حيوانات غير مجترة، وكذلك بعض المنتجات العرضية للحيوانات المجترة مثل الدم والجيلاتين والدهون. ولكن هذه القوانين قد تتغيّر، إذ إن الدراسات الحديثة تقترح إمكانية انتشار BSE بين الأبقار والخنازير والطيور والحيوانات الأخرى، أو من الأبقار للعجول.

لقد منع القسم الزراعي الأمريكي استيراد المواشي أو اللحوم المنتجة في البلدان التي ظهرت فيها إصابات BSE. وحالياً لم تُسجّل أي حالة من BSE في الولايات المتحدة الأمريكية، وبسبب اعتبارات كون nvCJD قد ينتشر بوساطة نقل الدم فإن كندا والولايات المتحدة منعت نقل الدم من أشخاص أمضوا 6 أشهر في بريطانيا بين الأعوام 1980 و 1986.

وبعد سنوات مضنية من البحث والدراسة حول الاعتلال الدماغي الأسفنجي، أنجز العلماء خطوات قيّمة في التحرّي عن ماهيّة هذا المرض، خصوصاً وأنه من الصعب دراسته، لأنه لا بُدّ من حقن الدماغ المصاب في أدمغة حيوانات تجريبية أخرى، ويحتاج تطوّر المرض إلى أشهر أو سنوات، وما يزيد الأمر تعقيداً كون العامل المرضي ليس فيروساً أو بكتريا، وأن الحيوانات المصابة لا تكون تجاهه أيّة أجسام مضادّة.

هذا ولم يتم التوصل إلى علاج للمرض لحدّ الآن. والطريقة الوحيدة لجعل التشخيص دقيقاً هو فحص أنسجة الدماغ بعد الموت. إن العامل المرضي لا يتأثر

بالإشعاع وإنزيمات الـNucleases التي تحطّم الأحماض النووية، ومع ذلك فإنه يتحطّم بوساطة بعض العوامل التي تحلّل أو تحوّر البروتينات.

في أوائل الثمانينيات قام العالم الأمريكي Stanley Prusiner بتنقية العامل المرضي، واستنتج بأنه يتكوّن من بروتين فقط، واقترح بأن مرض Scrapie ينتشر من خلال جسيمات بروتينية معدية تدعى (Prion). ولكن الفرضية التي بُنيت على تلك النتائج كانت قد رُفضت من قِبل أغلب العلماء طالما أن الفكرة حول العامل الممرض هو اشتراط احتوائه على DNA أو RNA كمواد وراثية قابلة للتوريث. مع ذلك، قدّم Prusiner وغيره أدلة تُسند فرضية البرايون، وأن المرض يمكن أن ينتقل بجسيمات مرضية غير وراثية.

إذا كان البرايون يتركب من بروتين فقط، فكيف يسبب المرض؟ قد يكون الجواب غريباً، فالبروتين الذي يتركب منه البرايون (PrP) هو نسخة محوّرة من البروتين الطبيعي المصنوع في الخلايا العصبية، وموجود في أدمغة كل الحيوانات البالغة. كما أن الاختلاف بين PrP الطبيعي و PrP برايون يتمثّل في التراكيب الثانوية للبروتين، إذ ينطوي PrP الطبيعي غير المعدي بهيئة حلزون ألفا (α-helices)، في حين أن PrP البرايون المعدي ينطوي بهيئة صفائح بيتا (β-sheets). وعندما تتلامس جزيئة PrP طبيعية مع جزيئة PrP برايون، فإن البروتين الطبيعي يُعاد طيّه بطريقةٍ ما، ويتحوّل إلى PrP مُمرض غير طبيعي، وحالما يتحوّل PrP الطبيعي إلى PrP غير طبيعي، تنتشر الأشكال المُميتة إلى جزيئات الـPrP الطبيعية المجاورة، وتستمر العملية بهيئة تفاعل مُتسلسل، وهنا تكمن إحدى التحوّلات الحرجة للخطورة.

إن PrP الطبيعي هو عبارة عن بروتين ذائب يتحطّم بسهولة بوساطة الحرارة والإنزيمات المُحلّلة للبروتينات، ولكن PrP المُمرض لا يذوب في المنظّفات، ويقاوم الحرارة وإنزيم الـProtease المُحلّل للبروتينات، وتقريباً غير قابل للتحطيم، بسبب تلك التغيرات التركيبية. وعليه تُعدّ اعتلالات الدماغ الأسفنجي أمراض من بروتينات ذات تركيب ثانوي.

وفي خضمّ ذلك فإن كثيراً من التساؤلات المهمّة تحتاج للدراسة، منها: ما مدى التلوّث بالـBSE في المحتوى الغذائي العالمي؟ وكم عدد البشر المصابين بالمرض nvCJD والذين لم تظهر عليهم الأعراض لحدّ الآن؟ وهل يمكن للبشر أو الحيوانات أن تكون حوامل لمرض البرايون وغير واضحة الأعراض؟ وهل بالإمكان تواجد البرايونات في أجزاء أخرى من الجسم فضلاً عن أماكن الإصابة الطبيعية المتمثّلة بالدماغ والحبل الشوكي، وإذا كان كذلك، هل يستطيع nvCJD الانتقال من خلال نقل الدم، أو من الأم إلى الجنين، أو بوساطة الأدوات الجراحية وأدوات أطباء الأسنان المعقّمة؟ هل نستطيع تطوير اختبارات تشخيصية وعلاجات للـBSE والـnvCJD ؟ وهل نحن على مقربة من نهاية قصة الـBSE أم بدءنا الآن ؟

الفصل الثالث

مستويات تنظيم الـ DNA في الكروموسوم



الفصل الثالث

مستويات تنظيم الـDNA في الكروموسوم

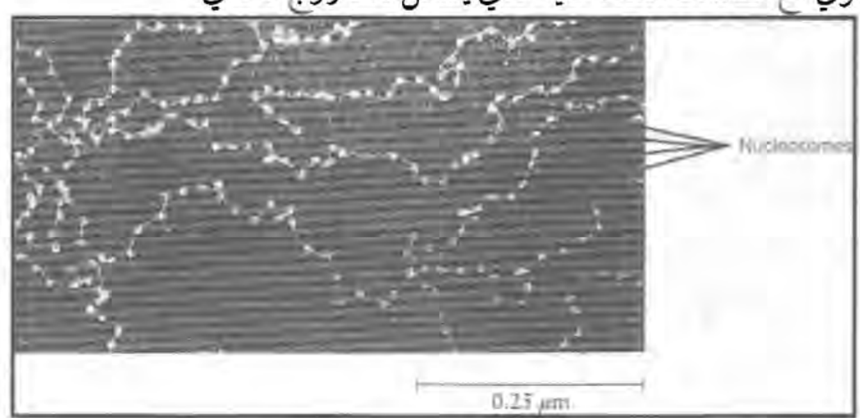
إن تسلسل جينوم الإنسان تتخلّله بعض الثغرات التي يتشكّل الغالبية منها من الهيتروكروماتين ذو التكرار والتكثّف العالي والذي يحتوي على تسلسلات مشفّرة قليلة.

أن الحجم الكلّي المُخمّن لجينوم الإنسان هو 3200 مليون (3.2×10^9) زوج قاعدي للـDNA أو 3.2 كيكا زوج قاعدي (Gigabase Pairs، 10^9 bp = 1Gbp)، ومنه 2.95 Gb يكون هيتروكروماتين. وإذا تصورنا أن الصفحة النموذجية لأي كتاب تحتوي تقريباً 3000 حرفاً، وعليه فإن جينوم الإنسان سيملأ ما يقارب مليون صفحة. وكما هو معروف بأن أغلب الـDNA للكائنات الراقية هو غير مُشفّر ويتضمّن المناطق بين الجينية (Intergenic regions) والأنترونات (Intons) والتسلسلات المتكررة (Repetitive sequences). وهناك ما يقارب 28٪ من DNA الإنسان يتم استنساخه بهيئة RNA، ولكن طالما أن النسخ الأولية لهذا الـRNA تتضمّن أنترونات، فإنه مجرّد 1.25٪ من التسلسل هي في الحقيقة تُشفّر إلى بروتينات. وبالمعدل فإن الأنترونات تكون أطول في DNA الإنسان مقارنةً بالكائنات الأخرى. وفي جينوم الإنسان يوجد كلاً من المناطق الغنية بالـA – T والغنية بالـG – C، وممّا يُلفت النظر بأن التسلسلات الغنية بالـG – C تمتلك كثافة جينية أعلى، وتكون فيها الأنترونات أقصر، ولكن أهمية ذلك غير معروفة. كما أن أكثر من نصف جينوم الإنسان يتضمّن تسلسلات متكررة (Repeated sequences).

لقد أظهرت دراسات المجهر الإلكتروني بأن الكروماتين المعزول يتألّف من وحدات تركيبية متكررة يُطلق عليها النيوكليوسومات (Nucleosomes) والتي تترتّب بمسافات على طول الـDNA مثل خرزات (Beads) المسبحة (شكل 3 – 1). إن كل

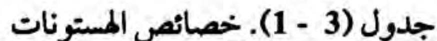
نيوكليوسومة تتألف من تجمّع ثمان (Octamer) هستونات (Histones: كريات بروتينية موجودة في حقيقيات النواة فقط) (جدول 3 – 1)، بحيث يلتف الـDNA على هذه الثمان هستونات كما يلتف الخيط على بكرة الخياطة لمسافة تقارب 146 زوج قاعدي لكل نيوكليوسومة (شكل 3 – 2). يتألّف التجمع الثماني من اثنين لكل من الهستونات H2A و H2B و H3 و H4. ويُكوّن ذلك محور اسطواني بحدود 5.5 × 10 نانوميتر، بحيث يلتف حوله الـDNA بشكل يساري فائق الالتفاف (Left-handed superhelix) بما يقارب لفّتين تقريباً. ويُعتقد بأن الهستونات H3 و H4 تُشكّل مركز المحور، ولذلك فإنها تترافق مع التفاف العروة الرئيسة للـDNA، في حين أن الهستونات H2A و H2B ترتبط مع الـDNA عند كل من نهايتي العروة.

تنفصل النيوكليوسومات الواحدة عن الأخرى بواسطة الـDNA الفاصل أو الرابط (Spacer or linear DNA)، إذ إن معاملة الألياف الكروماتينية بإنزيم الـDeoxyribonuclease يؤدي إلى تقطيع الـDNA الفاصل وتحرير النيوكليوسومات الحرة. وعند البداية فإن كل نيوكليوسوم متحرر بهذه الطريقة يمتلك ما يُقارب 200 زوج نيوكليوتيدي، ولكن استمرار عملية التقطيع (الهضم الإنزيمي) يؤدي إلى تحلّل الـDNA الفاصل بشكل كامل تاركاً جسيمة المحور (Core particle) المؤلّفة من الثُماني الهستوني مع الـDNA المُلتف عليه الذي يُشكّل 146 زوج قاعدي.



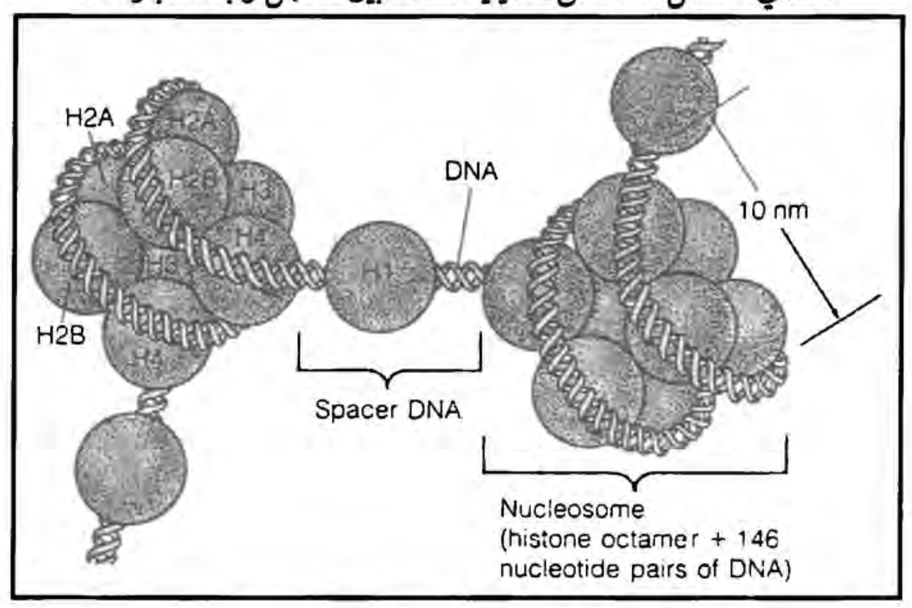
شكل (3 – 1). النيوكليوسومات

تظهر كتراكيب شبيهة بخرزات المسبحة على طول الألياف الكروماتينية، مُحضّرة من خلايا الدم الحمراء للدواجن، ومُصوّرة بالمجهر الإلكتروني


جدول (3 - 1). خصائص الهستونات

الصنف	التركيب الكيميائي	الوزن الجزيئي	التغاير بين الأنواع
H1	غني باللايسين Lysine-rich	21000 – 19500	متغاير بشكل كبير (*)
H2B, H2A	غني باللايسين بشكل بسيط Slightly lysine-rich	17000 – 13000	متغاير بشكل معتدل
H4, H3	غنية بالأرجنين Arginine-rich	15000 – 11500	غير متغايرة بشكل كبير (*)

(*) لتوضيح الاختلاف في التباين في الهستونات، على سبيل المثال هناك 40 اختلاف في تسلسل الأحماض الأمينية للـH1 بين العجل وذبابة الفاكهة، وكلن هناك اختلافين فقط في تسلسل الأحماض الأمينية للـH4 بين العجل ونبات البازلاء.



شكل (3 – 2). تركيب النيوكليوسوم

إن عدد الأزواج النيوكليوتيدية للـDNA الفاصل بين النيوكليوسومات المتعاقبة هو بمعدل يُقارب 50 – 60 bp، ولكن من الممكن أن يتغاير اعتماداً على مصدر

الـDNA، فهو يتراوح من عدد قليل بحدود 20 زوج نيوكليوتيدي إلى ما يقارب 100 زوج نيوكليوتيدي. كما أن أهمية هذا التباين غير معروف، ومن غير المعروف تماماً لماذا هذا التنظيم في المسافات بين النيوكليوسومات على طول الـDNA، ولماذا تترافق االهستونات بشكل تفضيلي مع تسلسلات نيوكليوتيدة خاصة.

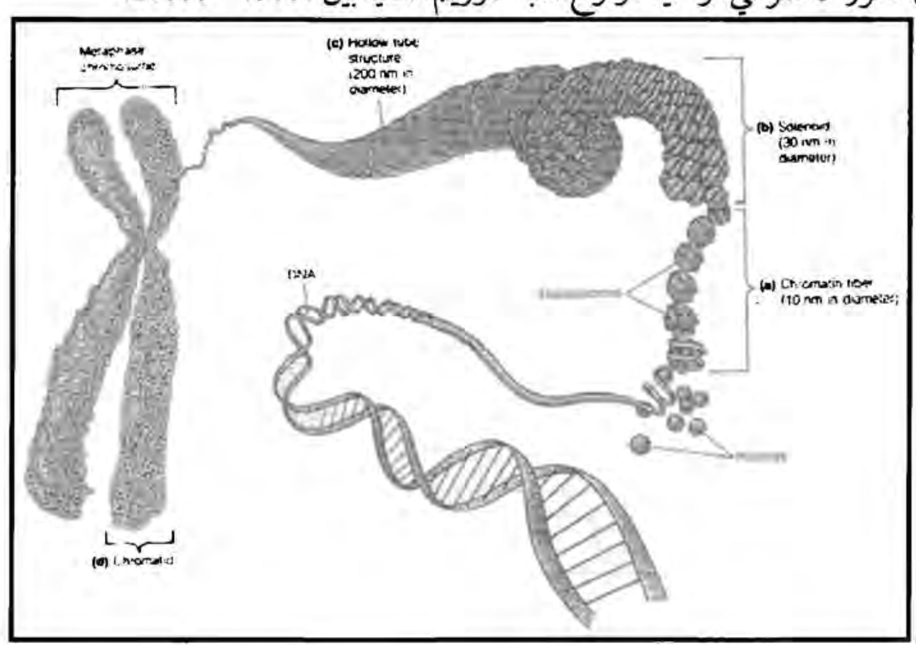
هذا ولا يُشكّل هستون H1 جزء من تركيب النيوكليوسومة، ولكنه بدلاً من ذلك يترافق مع الـDNA الفاصل بين النيوكليوسومات، ولذلك يُعتقد بأنه يعمل على ضم النيوكليوسومات المتجاورة بالقرب من بعضها لتكوين الليف الكروماتيني (Chromatin fiber) (شكل 3 – 3 – a). إذ يبلغ سمك هذه اللياف ما يُقارب 10 نانوميتر، وهي تُشكّل العنصر التركيبي الرئيسي لكروموسومات حقيقيات النواة. وتحت الظروف الطبيعية يُكوّن الليف الكروماتيني التفاف حلزوني يُسمّى السولينويد (Solenoid) بسمك يُقارب 30 نانوميتر. إن كل لفّة من التفافات السولينويد تتألّف من ست نيوكليوسومات تقريباً (شكل 3 – 3 – b). يلعب H1 دوراً مهماً في استقرارية تركيب السولينويد، إذ إن غيابه يؤدي إلى فقدان هذا التنظيم. يلتف السولينويد هو الآخر مرة أخرى ليُكوّن مستوى أكثر تعقيداً يُسمّى الأنبوب المُجوّف (Hollow tube) بحدود 200 نانوميتر (شكل 3 – 3 – c). في الخلايا التي لا تكون في حالة انقسام، فإن التكثّف الكروموسومي يقل ويميل للارتخاء.

وحالما تتحضّر الخلايا للدخول في الانقسام، تصبح كروموسوماتها أكثر تكثّف، إذ إن هذا التكثّف لا يزال يتضمّن مستويات التفاف عالية، التي فيها الأنابيب المجوّفة بقطر 200 نانوميتر الموجودة في الطور البيني (Interphase) (بين الانقسامات) سوف تكوّن الكروماتيدات بقطر 600 نانوميتر الموجود في كروموسومات الطور الاستوائي (Metaphase) (شكل 3 – 3 – d).

يتم تقدير امتداد (ارتخاء) الـDNA الملفوف كمياً من خلال نسبة الترزيم (Packing ratio) والتي تُعرّف بأنها طول جزيئة الـDNA الخطي (Linear DNA) مقسوماً على طول الكروموسوم أو الليف المُعبّئ فيه. إن الالتفاف الابتدائي للـDNA حول المحاور الهستونية للنيوكليوسومات يُقلّل الطول بمقدار 7 مرات، وأن تكوّن

السولينويد يؤدي إلى تكثّف إضافي بمقدار 6 أضعاف، لذلك تكون نتسبة الترزيم لتركيب السولينويد بحدود 42. إن التفاف السولينويد في الأنابيب ذات القطر 200 نانوميتر تُكثّف طول الـDNA بمقدار 18 مرة، وهذا يجعل نسبة الترزيم الكلية ابتداءً من جزيئة الـDNA الخطي وحتى الأنبوب المجوّف للطور البيني هي بحدود 750.

تكون نسبة الترزيم لكروموسومات الطور الاستوائي عالية بسبب التكثيف الإضافي الذي يحدث حال دخول النواة في الانقسام. فعلى سبيل المثال يحتوي الكروموسوم النموذجي للإنسان على DNA بطول يقارب 75 ملم، وبطول يُقارب 4 أو 5 مايكروميتر في الطور الاستوائي. وعليه تتراوح نسبة الترزيم الكلية بين 15000 – 20000.



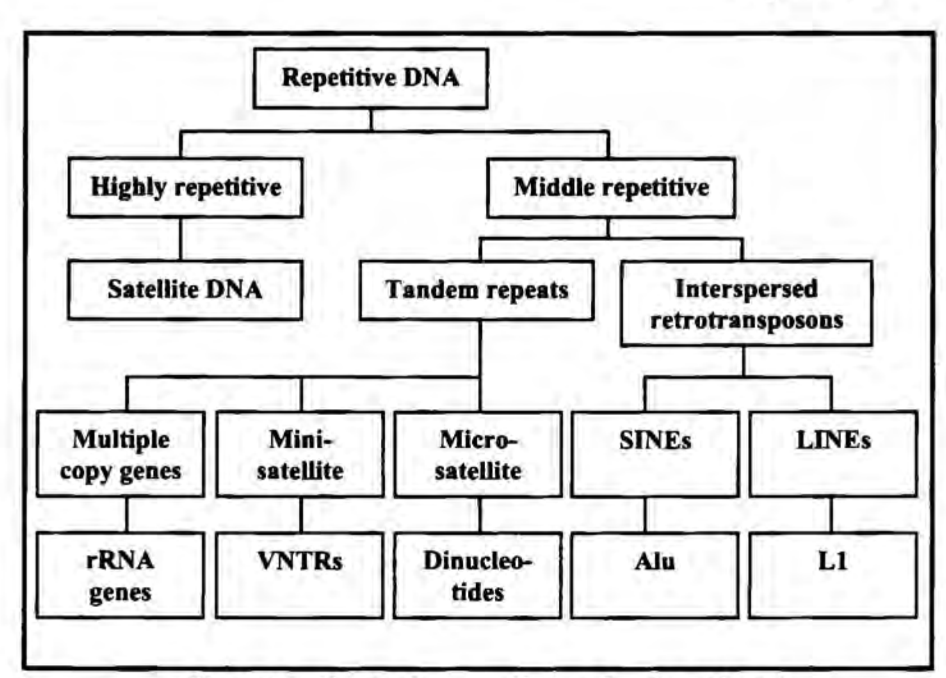
شكل (3 – 3). ترزيم النيوكليوسومات في الكروموسوم

جينومات حقيقيات النواة تُظهر تنظيم تسلسل مُعقّد يتميّز بالـDNA المتكرر:

فضلاً عن النسخ المفردة من تسلسلات الـDNA المتفرّد التي تكوّن الجينات، فهنالك عدد كبير من تسلسلات الـDNA ضمن الكروموسومات تكون متكررة في طبيعتها، وهنالك مستويات مختلفة من التكرار تحدث ضمن جينوم الكائن الحي. لقد تمت دراسات عديدة ركّزت على هذه التسلسلات، وفيها وُجدت أصناف مختلفة من

تلك التسلسلات وتنظيمها ضمن الجينوم. الشكل (3 – 4) يوضّح مراتب مختلفة من متكررات الـDNA، كما يُبيّن بأن بعض الجينات الفعالة (Functional genes) موجودة بأكثر من نسخة (يُشار لها بالجينات متعددة النسخة Multiple copy genes). مع ذلك فإن الغالبية من التسلسلات المتكررة تكون غير جينية (Nongenic)، وفي الحقيقة فإن أغلب التسلسلات المتكررة لا يُعرف لها وظيفة معينة، وسوف نُشير هنا إلى ثلاث مراتب رئيسية:

1. الكروماتين المتباين (Heterochromatin) الموجود بصحبة السنتروميرات ويُكوّن التيلوميرات.
2. المتكررات المترادفة لكل من تسلسلات الـDNA القصيرة والأطول.
3. التسلسلات القفّازة (المُتنقّلة Transposable sequences) والتي تنتشر في جينومات حقيقيات النواة .



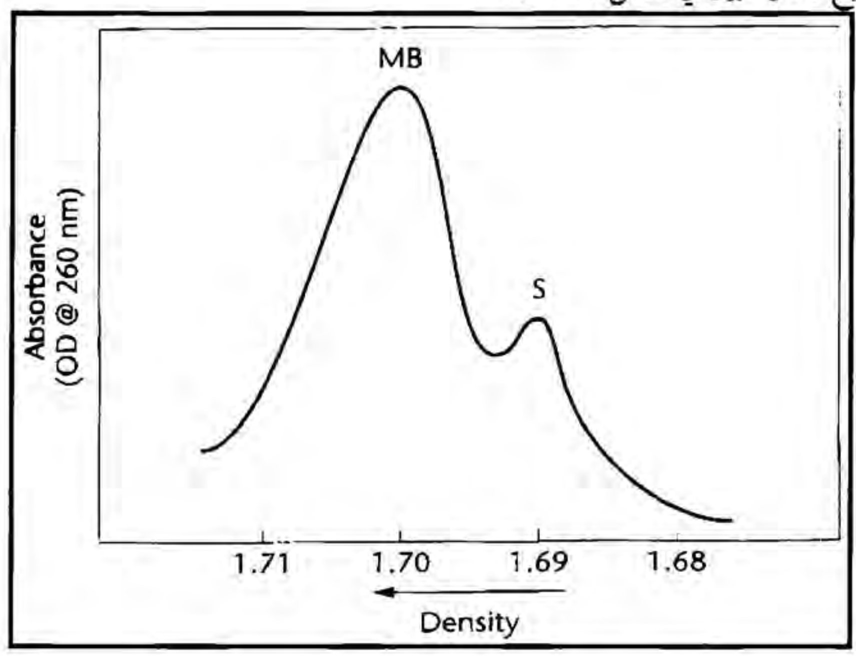
شكل (3 – 4). ملخص للمراتب المختلفة للـDNA المتكرر

الـDNA المتكرر و DNA التوابع

Repetitive DNA and Satellite DNA

إن التركيب النيوكليوتيدي للـDNA (يعني نسبة ازدواج G ≡ C مقابل A = T) لنوع معيّن يُعكس في كثافته، والذي يمكن قياسه بالطرد المركزي متوازن الترسيب (Sedimentation equilibrium centrifugation). عندما يتم تحليل DNA حقيقيات النواة بهذه الطريقة فإن الغالبية منه يكون قمة منحنى مفردة رئيسية أو حزمة بكثافة متماثلة.

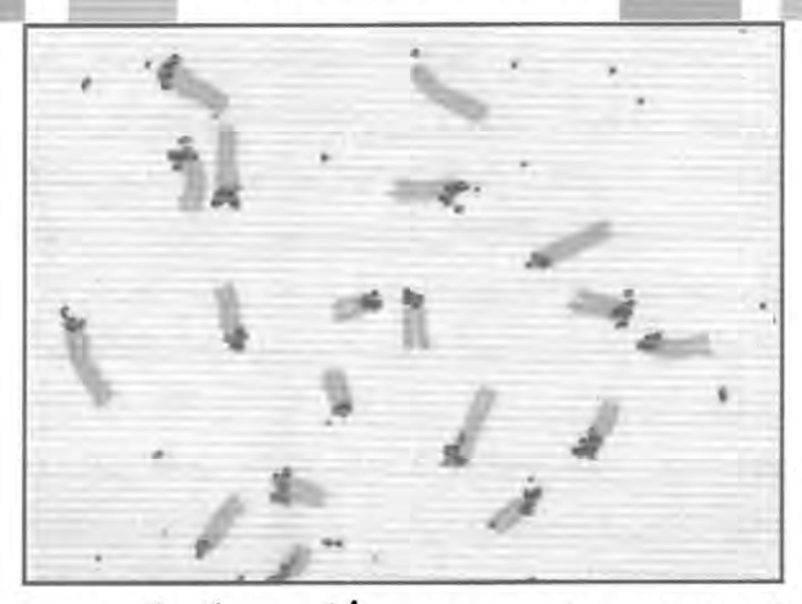
مع ذلك تظهر قمة إضافية أو أكثر للـDNA تختلف بشكل بسيط في الكثافة، مثل تلك القمة تسمّى الـDNA التابع (Satellite DNA) يمثّل نسبة متغايرة من الـDNA الكلي اعتماداً على نوع الكائن، كما هو الحال في نمط الحزمة الرئيسية والتابع للفأر المُبيّن في شكل (3 – 5).



شكل (3 – 5). فصل الحزمة الرئيسية MB (Main band) والتابع S (Satellite) للـDNA من الفأر باستخدام الطرد المركزي الفائق (Ultracentrifugation) في متدرج كلوريد السيزيوم CsCl

لقد ظلّت أهمية التوابع مجهولة حتى أواسط الستينات عندما طوّر كل من David Kohne, Roy Britten تقنية لقياس حركيات إعادة الاتحاد للـDNA، إذ أوضح الباحثان بأن نسبة معينة من الـDNA يُعاد اتحادها بسرعة أكثر من غيرها، واستنتجوا بأن سرعة إعادة الاتحاد هي ميزة لقطع DNA متعددة تتضمّن تسلسلات نيوكليوتيدية متماثلة أو شبه متماثلة، وهذا أساس ما أُصطلح عليه بالـDNA المتكرر (Repetitive DNA)، وهو على العكس من DNA بدائيات النواة الذي يتمثّل بتسلسلات ذات نسخ مفردة (Single-copy sequences).

عندما يوضع الـDNA التابع للتحليل بواسطة حركيات إعادة الاتحاد، فإنه يقع في مرتبة الـDNA ذو التكرار العالي (Highly repetitive DNA) والذي يُعرف عنه بأنه يتكوّن من تكرار تسلسلات قصيرة لعدد كبير من النسخ. وهنالك أدلّة أخرى اقترحت بأن تلك التسلسلات موجودة بهيئة متكررات مترادفة تتجمّع في مناطق كروموسومية متخصصة جداً بهيئة كروماتينية مُتباينة (Heterochromatic)، وهي المناطق التي تقع على خواصر السنترومیرات. وقد تم اكتشاف ذلك عام 1969، عندما قام بعض الباحثين ومنهم Mary Lou Pardue وJoe Gall بتطبيق تقنية التهجين الجزيئي الموقعي (In situ molecular hybridization) لدراسة الـDNA التابع، إذ تتضمَن التقنية التهجين الجزيئي بين الأجزاء المعزولة من مجسّات DNA أو RNA معلمة إشعاعياً (Radioactivity-labeled DNA or RNA) والـDNA المتواجد في الكروموسومات للتحضيرات الخلوية. بعد طريقة التهجين يتم التصوير الشعاعي الذاتي لتحديد موقع المناطق الكروموسومية المُكملة مع المجسّات. في تجربة Pardue وGall أظهرا بأن المجسّات المُصنّعة من الـDNA التابع للفأر تتهجّن مع DNA المناطق السنترومیرية للكروموسومات في طور الانقسام (شكل 3 – 6).

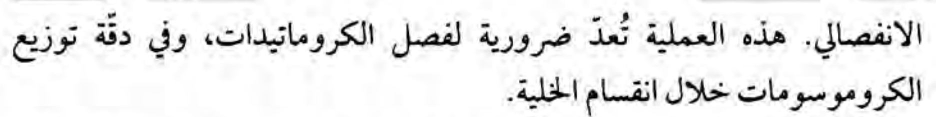


شكل (3 – 6). التهجين الموقعي بين المجس المُعلّم إشعاعياً المتمثّل بالـDNA التابع والكروموسومات في طور الانقسام، إذ يلاحظ بأن الحبيبات السوداء في التصوير الإشعاعي الذاتي تحدد المناطق الكروموسومية (السنتروميرات) التي تحتوي على تسلسلات الـDNA التابع

تسلسلات الـDNA السنتروميري Centromeric DNA sequences

تم وصف السنتروميرات في أواخر القرن التاسع عشر كتراكيب أولية في كروموسومات حقيقيات النواة، تلعب بعض الأدوار المهمة خلال الانقسام الميتوزي والميوزي، فهي:

1. مسؤولة عن المحافظة على تلاصق الكروماتيدات الشقيقة قبل الطور الانفصالي (Anaphase stage)، إذ تمثّل نقطة السنترومير على طول الكروموسوم والتي فيها تبقى الكروماتيدات الشقيقة (Sister chromatids) بهيئة مزدوجة خلال المراحل المبكرة من الانقسام الميتوزي والميوزي.
2. تمثل موقع تكوين الكاينيتوكور (Kinetochore)، وهي الأشكال الصفيحية البروتينية التي تتنظّم حول السنترومير، وتلاصق النبيبات الدقيقة المكوّنة لألياف المغزل. ولذلك فإن السنتروميرات تتوسّط هجرة الكروموسومات خلال الطور



الانفصالي. هذه العملية تُعدّ ضرورية لفصل الكروماتيدات، وفي دقّة توزيع الكروموسومات خلال انقسام الخلية.

إن أغلب عمليات عدم الدقة خلال الانقسام الميتوزي على أعلاها تكون أقل من $1 \times 10^{-5} - 1 \times 10^{-6}$ أو خطأ واحد لكل 100000 – 1000000 انقسام خلوي. ونتيجة لذلك يفترض بشكل عام أن تحليل تسلسل الـDNA للمناطق السنتروميرية يعطي بُعداً إلى آفاق مستقبلية مهمّة لتلك المناطق التي أُشير إليها بالرمز CEN والتي تم تعريفها وتحديدها في عدد من الكروموسومات.

في الإنسان واحد من أهم تسلسلات DNA التوابع المُميّز، وهو ما يُسمّى بعائلة Alphoid family والموجودة بشكل أساسي في المناطق السنتروميرية، وهي مكوّنة من 171 زوج قاعدي بشكل ترادفي متكرر بشكل رأسي – ذيلي (Head-to-tail) لتشكّل ما يصل إلى 3 مليون زوج قاعدي. ومثل هذا التكرار موجود في حيوانات ثديّية أخرى من رتبة الرئيسيات (Primates) ذات علاقة تطورية وثيقة، مع العلم بأنه ليس تسلسل أو إعداد متكررات الـ171 زوج قاعدي محافظ عليها. كما أن الدور الحقيقي لتلك التسلسلات ذات التكرار العالي في DNA السنترومير لا يزال غير واضح، ولكن يُعرف عنها بأنها تسلسلات لا يتم استنساخها .

تسلسلات الـDNA الطرفي (التيلوميري) Telomeric DNA sequences

هنالك أيضاً تركيب ذو أهمية كبيرة وهو التيلومير (Telomere)، يمثّل جزء من الكروموسومات، بحيث يتواجد في نهايات الكروموسوم الخيطية. إن وظيفة التيلوميرات (كما ذكرنا في الفصل الثاني) هي إعطاء استقرارية للكروموسوم، وجعل نهايات الكروموسوم بشكل عام خاملة في تداخلها مع نهايات كروموسومية أخرى. وعلى العكس من الكروموسومات المكسورة والتي قد يُعاد اتصال نهاياتها مرةً أخرى مع نهايات أخرى، فإن المناطق التيلوميرية لا تتّحد مع واحدة أخرى أو مع النهايات المكسورة. ويُعتقد بأن بعض النواحي في التركيب الجزيئي للتيلوميرات يجب أن يكون متفرداً، مقارنةً مع مناطق الكروموسوم الأخرى.

هنالك نوعان من التسلسلات التيلوميرية تم اكتشافها:



1. النوع الأول: يُدعى ببساطة تسلسلات DNA تيلوميرية (Telomeric DNA sequences): تتضمّن متكررات مترادفة صغيرة، وهي تلك المجموعة التي تُساهم في استقرارية وكمالية الكروموسوم. في الهدبيات (Ciliate) مثل ***Tetrahymena*** أكثر من 50 متكرر ترادفي من تسلسلات سداسية GGGGTT موجودة. وفي الإنسان يتكرر التسلسل GGGATT لمرات كثيرة. إن تحليل هذه التسلسلات أظهر بأنها مُحافظ عليها بشكل كبير خلال التطور، وهذا يعكس الدور الحرج الذي تلعبه في الحفاظ على كمالية الكروموسومات.
2. النوع الثاني : وهي التسلسلات المصاحبة – التيلوميرية Telomeric – associated sequences: وهي تتكوّن كذلك من تسلسلات متكررة، وتكون مجاورة وضمن التيلومير. هذه التسلسلات تتغاير بين الكائنات، وأهميتها لازالت غير معروفة.

إن تضاعف التيلومير يتطلّب إنزيماً متميزاً يحتوي على RNA يُسمّى Telomerase. وبغيابه فإن DNA في النهايات الكروموسومية يصبح أقصر خلال كل تضاعف. في الكائنات متعدّدة الخلايا مثل الإنسان، فإن التيلوميرات مهمة في الخطوط الخلوية الجرثومية (Germ-line cells)، ولكنها غير فعّالة في الخلايا الجسمية، كما أن عملية تقصير الكروموسوم تُعدّ جزءاً من الآليات الطبيعية في شيخوخة الخلايا. في الخلايا السرطانية البشرية التي تصبح خالدة، يبدو أن التحوّل إلى حالة ورمية خبيثة يتطلّب تنشيط إنزيم التيلوميريز لكي يتم تجاوز الشيخوخة المرافقة للقصر الكروموسومي.

التسلسلات متوسطة التكرار: VNTRs والمتكررات ثنائية النيوكليوتيدات

Middle repetitive sequences: VNTRs and Dinucleotide repeats

بالإضافة إلى الـDNA عالي التكرار الذي يُشكّل 5٪ من جينوم الإنسان و (10٪ من جينوم الفأر) ، توجد مرتبة ثانية بما يسمّى بالـDNA متوسط التكرار (Middle or moderately repetitive DNA) والذي يتم تشخيصه بتحليل C_0t.



إن الغالبية السائدة من هذا النوع من الـDNA يتكوّن سواء من متكررات مترادفة التسلسلات متشتتة (منتشرة). هذا ولم يتم وصف أي وظيفة لهذا المكوّن من الجينوم. وكمثال عليه ما يُسمّى VNTRs (Variable number tandem repeats).

إن تسلسل DNA المتكرر من VNTRs قد يتكوّن من 15 – 100 زوج قاعدي في الطول، ويتواجد ضمن أو بين الجينات. وتوجد مثل تلك التجمعات منتشرة خلال الجينوم، ويُشار لها في الغالب بالـMinisatellites.

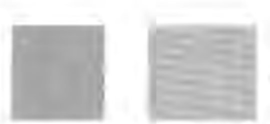
يتغاير عدد النسخ المتكررة لكل تسلسل خاص في كل موقع في الأفراد، مؤدياً إلى تكوين مناطق موقعية من 1000 – 5000 زوج قاعدي (1 – 5 كيلو زوج قاعدي) في الطول. ويُشار إلى التغاير في الحجم (الطول) لهذه المناطق بين الأفراد بما يكون بصمة الـDNA (DNA fingerprinting).

مجموعة أخرى من التسلسلات مترادفة التكرار تتكوّن من نيوكليوتيدات ثنائية، ويُشار لها أيضاً بالـMicrosatellites. وهي تشابه الـVNTRs في كونها منتشرة خلال الجينوم وتغايرها بين الأفراد في عدد تكراراتها الموجودة في أي موقع. فعلى سبيل المثال، في الإنسان، أكثرها شيوعاً هي الثنائيات النيوكليوتيدية $(CA)_n$، إذ n تساوي عدد التكرارات، وأكثر شيء شائع بالنسبة لـn هو بين 5 و 50. إن هذه التجمعات تستخدم أيضاً في الطب الشرعي، وكذلك يُستفاد منها كعلامات جزيئية (Molecular markers) في تحليل الجينوم.

التسلسلات القفّازة (المُتنقّلة) المتكررة

Repetitive Transported sequences: SINES and LINES

وهي مرتبة أخرى من الـDNA المتكرر والذي يتضمّن تسلسلات مُنتشرة خلال الجينوم، وليس متكررة ترادفياً، فهي قد تكون قصيرة أو طويلة، يُطلق عليها التسلسلات القفّازة (Transposable sequences) والتي تكون مُتنقّلة ويمكنها الحركة





إلى مواقع مختلفة ضمن الجينوم، مع العلم بأن نسبة كبيرة من جينومات حقيقيات النواة تتكوّن من مثل تلك التسلسلات.

فعلى سبيل المثال العناصر المنتشرة القصيرة SINES (Short interspersed elements) يكون طولها أقل من 500 زوج قاعدي، وقد تمثّل 500000 مرة أو أكثر من جينوم الإنسان. إن أفضل ما تمّ تصنيفه من تسلسلات SINE في الإنسان هو طاقم من التسلسلات ذات العلاقة القوية تسمّى عائلة *Alu* family (الاسم يعتمد على وجود تسلسلات DNA تتميّز بوجود موقع الإنزيم القاطع *Alu* I). مجموعة من أفراد هذه العائلة وُجدت كذلك في ثدييات أخرى، بطول 200 – 300 زوج قاعدي، وتكون منتشرة (أكثر من كونها متناسقة خلال الجينوم) بين وضمن الجينات. في الإنسان، هذه العائلة تشمل أكثر من 5٪ من الجينوم. وأشارت دراسات أخرى إلى أنها تُشكّل 2 – 3٪ من كل DNA الإنسان.

إن تسلسلات *Alu* ذات أهمية خاصة، على الرغم من أن وظيفتها لم يتم تحديدها لحدّ الآن، مع العلم أن مجموعات من عائلة *Alu* يتم استنساخها أحياناً، إذ إن دور الـRNA المستنسخ غير مؤكّد، ولكن يُعتقد بأنه ذو علاقة بقابلية الانتقال في الجينوم. وفي الحقيقة يُعتقد بأن تسلسلات *Alu* قد زادت من محتوى الـRNA والتي انتشر جزئها المكمّل من الـDNA خلال الجينوم نتيجةً لفعّالية إنزيم الاستنساخ العكسي (Reverse transcriptase).

وفيما يتعلّق بمجموعة العناصر المنتشرة الطويلة LINES (Long interspersed elements) فهي تمثّل تسلسلات DNA قفّازة متكررة، وفي الإنسان فإن أكثر مثال شائع هي العائلة التي يُرمز لها L1. مجموعات من عائلة هذا التسلسل بحدود 6400 زوج قاعدي طولاً، وتمثل ما يصل إلى 100000 مرة طبقاً لأحد التقديرات. كما أن نهايتها ′5 تكون كثيرة التغاير و لا يزال دورها في الجينوم غير معروف.

وحالياً ، فإن أساس انتقال عناصر L1 أصبح واضحاً، ففي البداية يتم استنساخ تسلسل الـDNA – L1 إلى جزيئة RNA. ثم يعمل RNA كقالب لتصنيع DNA مكمّل

باستخدام إنزيم الاستنساخ العكسي. وهذا الإنزيم يُشفّر له من خلال تسلسل L1. أن نسخة L1 الجديدة تتكامل فيها بعد في الـDNA للكروموسوم في موقع جديد، وبسبب هذا التشابه لميكانيكية هذا الانتقال مع الأسلوب المستخدم من قبل فيروسات Retroviruses، فإنه يُشار إلى LINES باسم Retrotransposons.

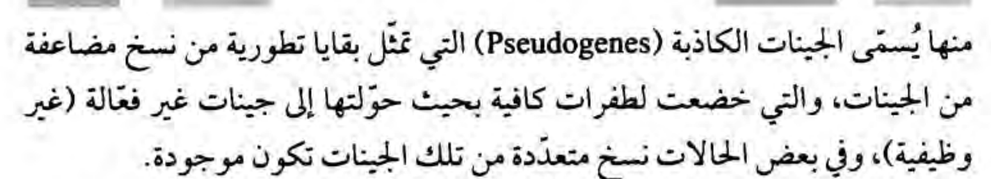
هذا وتمثّل STNES و LINES جزءاً مهماً من DNA الإنسان، إذ إن كلا النوعين في هذه العناصر تُشارك الحالة التنظيمية في تكوينها بنسبة لخليط بحدود 70٪ متفردة و 30٪ تسلسلات متكررة ضمن الـDNA، وبمجموعها تُشكّل ما يُقارب 10٪ من الجينوم.

الجينات عديدة النسخ ذات التكرار المتوسط

Middle repetitive multiple copy genes

يشتمل الـDNA متوسط التكرار في بعض الحالات على جينات فعّالة تتمثّل ترادفياً في نسخ متعددة، فعلى سبيل المثال عدد كبير من النسخ موجودة في الجينات المُشفّرة للـRNA الرايبوسومي، فذبابة الفاكهة *Drosophila* تمتلك 120 نسخة لكل نصف جينوم (Haploid genome). وتوجد وحدات جينية مفردة تُشفّر إلى جزيئة سابقة (أصل Precursor molecule) كبيرة والتي يتم تحويلها إلى كل من 5.8S، 18S و 28S من الـrRNA. وفي الإنسان تتجمّع نسخ متعدّدة من هذا الجين على الذراع P للكروموسومات الطرفية (Acrocentric chromosomes) 13، 14، 15، 21، 22. هذا وأن نسخ متعددة من الجينات المُشفّرة للـ5SrRNA يتم استنساخها (بشكل منفصل عن المجموعات المتعددة الموجودة سويةً) تقع على الجزء الطرفي للذراع P للكروموسوم رقم 1.

ولا بُدّ هنا من الإشارة إلى ملاحظة مهمة، وهي أن نسبة كبيرة من DNA جينوم حقيقيات النواة لا تُشفّر جينات فعالة. فإذا أخذنا سويةً الأشكال المختلفة من تسلسلات الـDNA ذات التكرار العالي والمتوسط، فهي تُشكّل ما يقارب 40٪ من جينوم الإنسان، فبالإضافة إلى الـDNA المتكرر، هنالك كمية كبيرة من تسلسلات الـDNA ذات النسخ المفردة (يتم التعرّف عليها بتحليل C_0t) غير المُشفّرة، وجزء بسيط



منها يُسمّى الجينات الكاذبة (Pseudogenes) التي تمثّل بقايا تطورية من نسخ مضاعفة من الجينات، والتي خضعت لطفرات كافية بحيث حوّلتها إلى جينات غير فعّالة (غير وظيفية)، وفي بعض الحالات نسخ متعدّدة من تلك الجينات تكون موجودة.

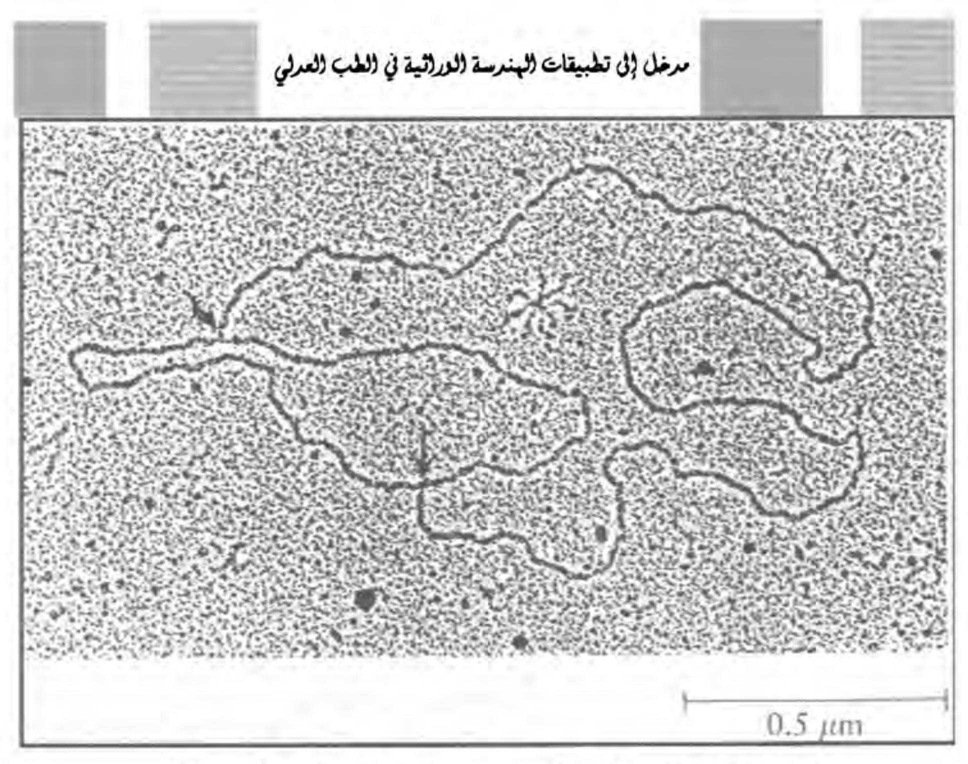
وعلى الرغم من أن نسبة الجينوم المكوّن للـDNA المتكرر تتغاير بين الكائنات الحية، يبدو أنها تشترك في أحد المظاهر، ، إذ إن جزءاً صغيراً جداً فقط يُشفّر إلى بروتينات. فعلى سبيل المثال 20000 – 30000 جين تُشفّر إلى بروتينات في قنفذ البحر (Sea urchin) تحتل أقل من 10٪ من الجينوم. وفي الدروسوفيلا فقط 5 – 10٪ من الجينوم تتمثّل بجينات مُشفّرة لبروتينات. أما في الإنسان، فيبدو بأنها بحدود 30000 جين فعّال تحتل أقل من 5٪ من الجينوم وفق البحوث الحديثة، مع العلم بأن دراسات سابقة أشارت إلى أنها تحتل أقل من 10٪ من الجينوم.

DNA المايتوكوندريا والكلوروبلاست

Mitochondrial and Chloroplast DNA

على الرغم من اهتمامنا في موضوعنا الحالي بـDNA المايتوكوندريا، ولكننا وجدنا من المناسب التعريج على DNA الكوروبلاست بهدف المقارنة والفائدة العامة.

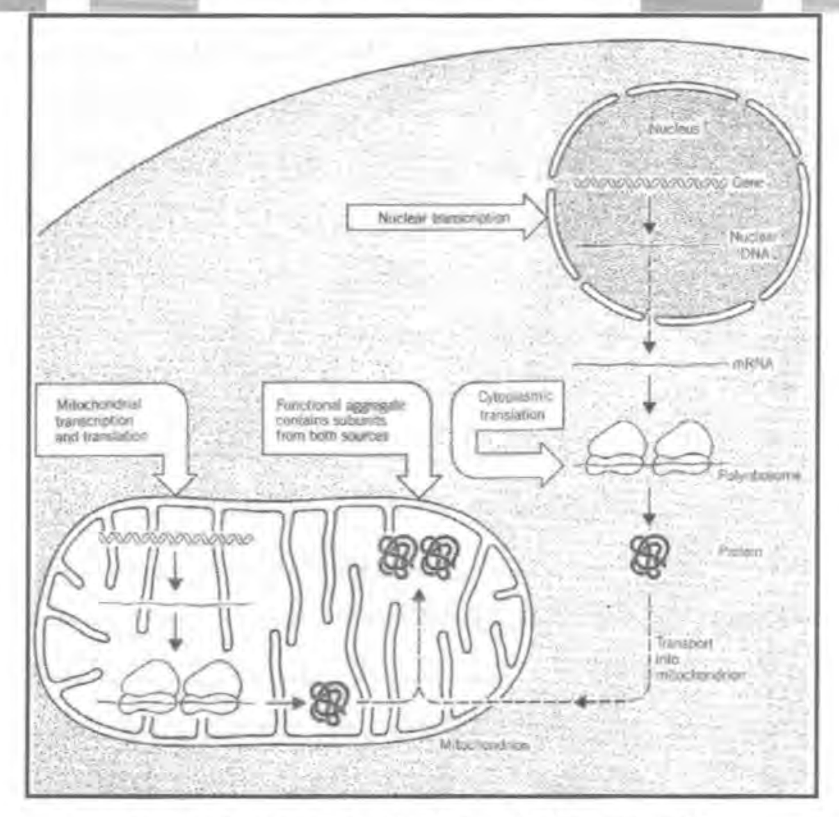
ليس كل الـDNA الموجود في خلايا حقيقية النواة موجود في النواة، فعلى الرغم من أن الـDNA النووي يحمل أغلب المعومات الوراثية للخلية، ولكن كل من المايتوكوندريا والكلوروبلاست تحتويان على بعض الـDNA الخاص بهما، فضلاً عن الآلية الضرورية للتضاعف والاستنساخ والترجمة للمعلومات المُشفّرة من ذلك الـDNA. يكون DNA هاتين العضيتين مُشابهاً لـDNA بدائية النواة من ناحية كونه عاري (Naked: غير مُلتف على الهستونات كما لوحظ في حقيقيات النواة)، كما أنه يكون حلقي (Circular) (شكل 3 – 7).



شكل (3 – 7). DNA المايتوكوندريا الحلقي في حالة تضاعف

الأسهم تُشير إلى شوكتي التضاعف الواقعتين على طرفي فقاعة التضاعف.

فضلاً عن ذلك فإن التركيب القاعدي لجينوم المايتوكوندريا والكلوروبلاست ي الغالب يختلف بشكلٍ كبير عن الجينوم النووي. وفي كلتا العضيتين يكون الجينوم صغيراً، لذلك فإن العضيتين تستطيعان التشفير لبعض (وليس كل) الببتيدات المتعدّدة لها، ولذلك فهما عضيات شبه ذاتية (Semiautonomous organelles) وقادرة على صنيع بعض الببتيدات المتعددة الخاصة بها، ولكن تعتمد على الجينوم النووي لتشفير غلب بروتيناتها (3 – 8).



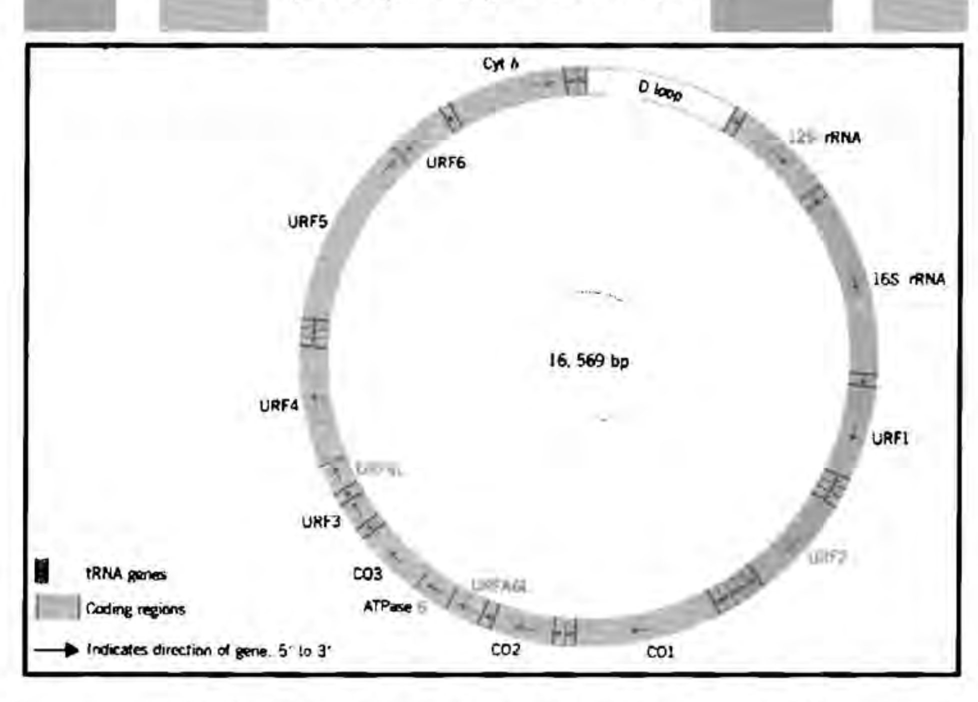
شكل (3 – 8). التجمّعات البروتينية للمايتوكوندريا تتركّب من نواتج تعبير الجينات النووية وجينات المايتوكوندريا.

إن الجينوم في مايتوكوندريا الإنسان على سبيل المثال، يتكوّن من DNA حلقي يتألّف من 15000 زوج قاعدي وبطول محيطي (Contour length) بحدود 5 مايكروميتر. إذ تستطيع هذه الكمية من الـDNA التشفير فقط لما يُقارب 12 منتج وجزء بسيط (بحدود 5٪) من جزيئات RNA وبروتينات تحتاجها المايتوكوندريا، ومع ذلك فإن هذا الـDNA يلعب دوراً وراثياً حيوياً، لأن تلك المنتجات تشمل جزيئات الـRNA الموجودة في رايبوسومات المايتوكوندريا وكل جزيئات الـtRNA اللازمة لتصنيع البروتين في المايتوكوندريا والوحدات الثانوية لبعض بروتينات هذه العضية والتي تشمل Cytochrome b و Cytochrome c oxidase و ATPase.

إن حجم جينوم المايتوكوندريا يتغاير بشكل كبير حسب النوع، فمثلاً مايتوكوندريا اللبائن نموذجياً تمتلك DNA بحدود 15000 زوج قاعدي. أما الخمائر فإنها تمتلك DNA بحدود 84000 زوج قاعدي، ولكنه بشكل عام يكون بحدود خمس مرات أكبر من DNA اللبائن، وفي النباتات يكون كبيراً ومُتغايراً ويتضمّن كل من الجزيئات الحلقية والخطية. ويبدو من خلال المقارنة بين DNA مايتوكوندريا الإنسان والخميرة بأن الـDNA الإضافي الموجود في مايتوكوندريا الخميرة يتضمّن تسلسلات طويلة غير مُشفّرة.

بالنسبة للجينات المُشفّرة للبروتينات في جينوم مايتوكوندريا الخمائر، فإنها يمكن أن تكون مُجزّأة (تحتوي على أنترونات)، أو غير مُجزّأة (مُكوّنة من أكسونات فقط). في حين لا يحتوي جينوم المايتوكوندريا في اللبائن على أنترونات. وفي حقيقة الأمر إن بعض الجينات فيه تكون متداخلة (Overlap)، وبشكل عام فإن كل زوج قاعدي في الجينوم لا بُدّ أن يعود إلى جين معيّن باستثناء منطقة عروة D (D-loop) المسؤولة عن بدء تضاعف الـDNA، إذ إنه ليس أكثر من 87 زوج قاعدي من مجموع 16569 زوج قاعدي في DNA مايتوكوندريا الإنسان يقع بين المناطق المُشفّرة. يتشكل جينوم المايتوكوندريا في اللبائن من 22 جين مسؤول عن tRNA وجينين مسؤولين عن rRNA و 13 منطقة تشفير بروتيني، إذ تم تحديد البروتين المُشفّر منه لبعضٍ منه، والبعض الآخر لا يزال غير معروف (مؤشّر بالحروف URF) (شكل 3 – 9).

ونجد من الطريف هنا الإشارة إلى دراسة Brown و Goodman (1979) التي تضمّنت 21 إنسان يعودون إلى عروق مختلفة (Different races) إذ وجدا بأن 14 فرد يمتلكون 64 موقع قطع متماثل في الـDNA المايتوكونديري في حين أن 7 أفراد قد أظهروا واحداً أو أكثر من الاختلافات.



شكل (3 – 9). ترتيب الجينات في جينوم مايتوكوندريا الإنسان

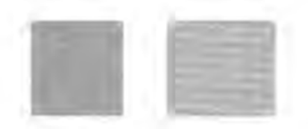
تحتوي الكلوروبلاست على DNA حلقي بحدود 130000 زوج قاعدي، فضلاً عن الـrRNA و tRNA، فإن جينوم هذه العضية يُشفّر إلى العديد من الببتيدات المتعدّدة تتضمّن واحدة من وحدتين ثانويتين موجودة في Ribulose-1,5-biphosphate carboxylase، وهو الإنزيم المُثبّت للكاربون في دورة Calvin.

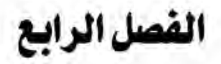
إن كل من الببتيدات المتعدّدة المُشفّر أليها بواسطة جينوم المايتوكوندريا والكلوروبلاست هي جزء ثابت من بروتين متعدّد الحدود (Multimeric)، إذ يحتوي أيضاً على وحدات ثانوية يُشفّر إليها بوساطة الجينوم النووي، فكل بروتين في العضية يتكوّن من وحدات ثانوية تكون هجينة (Hybrid)، ويتألّف من بعض الببتيدات المتعدّدة تُشفّر وتُصنع في العضية، وأخرى يُشفّر إليها من خلال الجينوم النووي، وتصنع بوساطة رايبوسومات السايتوبلازم (شكل 3 – 8).

الفصل الرابع

تداول الأحماض النووية







الفصل الرابع

تداول الأحماض النووية

في هذا الفصل سوف نستعرض بعض الطرق الأساسية في كيفية تداول وتحليل جزيئات الأحماض النووية، وعلى الرغم من أن موضوعنا ينصب بالدرجة الأساسية على استخلاص الـDNA من الإنسان، ولكن ذلك لا يُضير من التنويه على كائنات أخرى ولو كانت نباتية.

استخلاص الـDNA والـRNA:

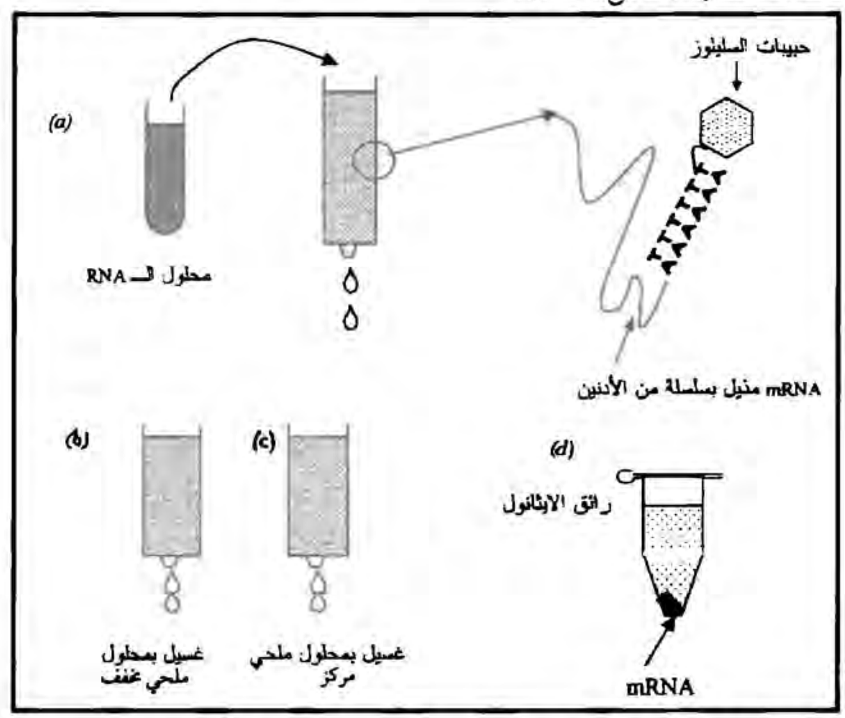
لا بُدّ وفي أيّة تجربة يستخدم فيها الجين من الحاجة إلى مصدر يُستخلص منه الحامض النووي سواء كان DNA أو RNA، وتتضمّن الخطوة الأولى في عملية الاستخلاص تفتيت المادة الأولية سواء كانت فايروسية أو بكتيرية أو فطرية أو نباتية أو حيوانية، ولتجنّب تضرّر الأحماض النووية المُراد استخلاصها، يُفضّل استخدام الإنزيمات المُحلّلة للجدار الخلوي (فيما يتعلّق بالخلايا الحاوية على الجدار مثل الخلايا النباتية)، مع استعمال المنظّفات الكيمياوية المُحلّلة للأغشية الخلوية. هذا ويُراعى عند الضرورة استخدام طريقة أكثر قساوة في سبيل تمزيق الخلايا (كما هو الحال لبعض الأجزاء النباتية)، إذ إنه قد يتعرّض الـDNA للتقطيع، الأمر الذي قد يُعيق إنتاج الجزيئات التركيبية النموذجية.

بعد عملية تمزيق الخلايا يتم التخلّص من البروتينات بالفينول أو خليط الفينول/ كلوروفورم مع الطرد المركزي، لتتجمّع الجزيئات البروتينية في طبقة الفينول الوسطى، وتتجمّع الأحماض النووية في الطبقة العليا للمحلول والتي يتم ترسيبها فيما بعد باستخدام الآيزوبروبانول (Isopropanol) أو الإيثانول المُبرّد خلال الطرد المركزي.

في حالة استخلاص الـDNA يُستخدم الإنزيم RNase (Ribonuclease) للتخلّص من الـRNA، أما في حالة استخلاص الـmRNA بهدف تصنيع الـDNA المُكمّل (cDNA) فيتم استخدام أعمدة السليلوز المربوط مع سلاسل الثايمين القصيرة



Oligo(dT)-cellulose التي ترتبط مع الذيل متعدّد الأدنين (Poly-A) الموجود في خيوط mRNA، إذ يُعطي هذا الأسلوب كمية كبيرة من الـmRNA ويُزيل أغلب المخلّفات العالقة به (شكل 4 – 1).



شكل (4 – 1). فصل mRNA باستخدام كروماتوغرافيا الألفة خلال عمود يحتوي على حبيبات السليلوز المربوطة مع سلاسل الثايمين القصيرة (Oligo(dT)-cellulose)

(a) يمر الـRNA الكلي (Total RNA) الموجود في المحلول خلال العمود، إذ تلتحم سلسلة الثايمين بالذيل متعدّد الأدنين (Poly-A) للـmRNA.

(b) تُغسل بقايا الـRNA (الأنواع الأخرى من الـRNA والمُخلّفات) بوساطة محلول منظّم منخفض الملوحة.

(c) يُستخلص الـmRNA باستخدام محلول منظّم عالي الملوحة لفك الارتباط بين A والـT.

(d) يُرسّب الـmRNA بالإيثانول المُبرّد خلال عملية الطرد المركزي.

هذا ويستخدم الطرد المركزي فائق السرعة (Ultracentrifugation) لتحضير الـDNA البلازميدي باستخدام محلول كلوريد السيزيوم Cesium chloride (CsCl) متدرّج الكثافة، وبعد فترة تصل إلى 48 ساعة يتكثّف الـDNA البلازميدي ويكوّن طبقة في مكان مُحدّد في أنبوبة الاختبار، إذ تؤخذ هذه الطبقة ويتم التخلّص من بقايا كلوريد السيزيوم من أجل الحصول على DNA نقي.

تداول وتقدير كمية الأحماض النووية:

في تجارب الكلونة تستخدم كميات ضئيلة من الأحماض النووية تقدّر بالمايكروغرام والنانوغرام والبيكوغرام، وذلك بعمل تخفيفات في الماء أو في محاليل مُنظّمة، ويحدّد التركيز بقياس الامتصاصية عند الطول الموجي A_{260} نانوميتر باستخدام جهاز المقياس الضوئي الطيفي (Spectrophotometer)، إذ يعادل المقياس 1 عند هذا الطول الموجي التركيز 50 مايكروغرام / ملي للحامض النووي DNA مزدوج الشريط، أو تركيز 40 مايكروغرام / ملي للحامض النووي DNA مفرد الخيط أو الـRNA. ولمعرفة درجة النقاوة في المحاليل المُحضَّرة من الـDNA (خلوّها النسبي من الفينول أو البروتين) يتم تقسيم مقدار القراءة عند الطول الموجي A_{260} على القراءة عند A_{280} والتي يجب أن تكون أكبر أو تساوي 1.8 للـDNA النقي، و 2 للـRNA النقي. والمعادلات التالية توضّح ذلك:

معادلة حساب تركيز الـDNA $O.D_{260nm} \times \text{Dilution factor} \times 50\mu g/ml = \mu g/ml$

معادلة حساب تركيز الـRNA $O.D_{260nm} \times \text{Dilution factor} \times 40\mu g/ml = \mu g/ml$

معادلة تقدير نقاوة الـDNA $\frac{O.D_{260nm}}{O.D_{280nm}} = or > 1.8$

معادلة تقدير نقاوة الـRNA $\frac{O.D_{260nm}}{O.D_{280nm}} = or > 2$

كما يمكن تقدير تركيز الـDNA من خلال شدّة صبغة بروميد الإثيديوم (Ethedium bromide) التي تندغم بين قواعد الـDNA وتعكس ضوءاً برتقالياً عند مرور الأشعّة فوق البنفسجية (UV)، وبقياس وميض العينة ومعايرتها مع العينة

القياسية، يمكن اكتشاف كمية ضئيلة من الـDNA قد تصل إلى نانوغرام واحد والتي يصعب قياسها باستعمال جهاز المقياس الضوئي الطيفي نتيجةً لوجود الشوائب.

يتم ترسيب الـDNA بالآيزوبروبانول أو الإيثانول، ويفضّل الأخير الذي يُضاف إلى المحلول بنسبة 2 : 1 وبوجود 0.2 مولار من الملح عند درجة صفر مئوي، إذ يُجمع الـDNA بالطرد المركزي في قاع الأنبوبة، ومن ثمّ يُنشّف ويُعاد تعليقه مرّةً أخرى في محلول مُنظم ويوزّع إلى كميات صغيرة تُحفظ في الثلاجة لحين الاستعمال.

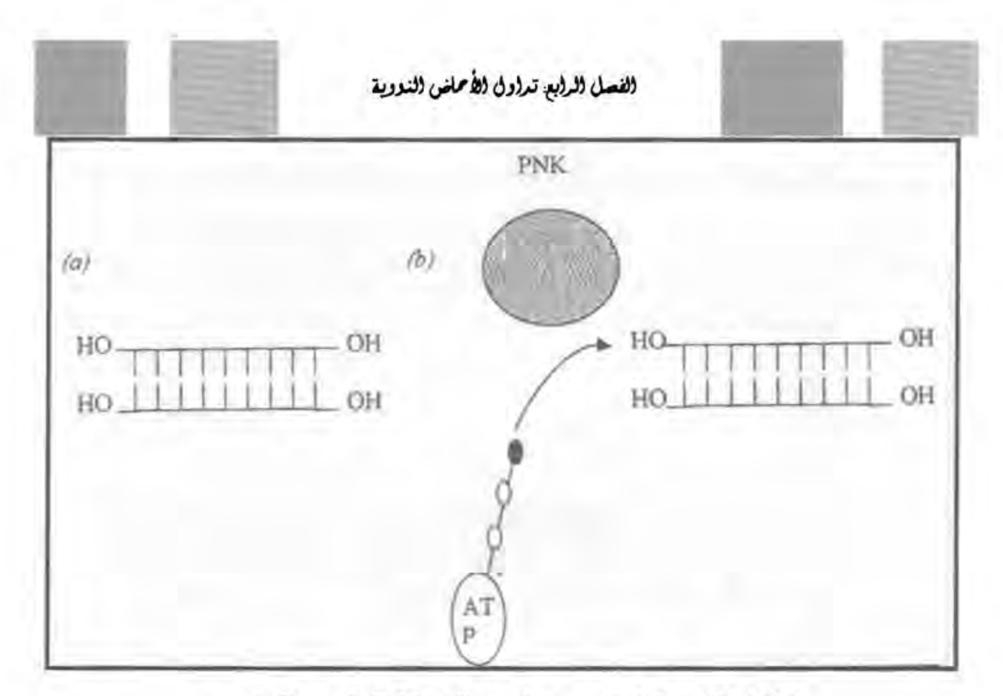
التوسيم الإشعاعي للأحماض وصناعة المجسّات:

نظراً لصعوبة تتبّع الكميات الضئيلة من الأحماض النووية أثناء خطوات العمل، فإن الحامض النووي يوسم إشعاعياً باستعمال الـdNTP (Deoxynucleoside triphosphats) المُعلّمة الحاوية على عناصر مُشعّة مثل الهيدروجين (^{3}H) أو الفسفور (^{32}P) والتي يُستدل عليها بالمقياس الوميضي (Scintillation counter).

إن الإجراء الآخر هو التهجين الجزيئي (Hybridization) الذي تستعمل فيه المجسّات المُشعّة (المُعلّمة). والاختلاف بين هذه الطريقة والطريقة أعلاه يعتمد بشكل كبير على النشاط الإشعاعي النوعي (Specific activity)، ففي الطريقة الأولى تستعمل عناصر منخفضة الإشعاع، أما في حالة المجسّات فتستعمل عناصر عالية الإشعاع مثل الفسفور المُشع (^{32}P)، وسيرد وصف الطرائق الشائعة للتوسيم (التعليم) في الفقرات اللاحقة.

التوسيم الطرفي End labeling:

يتم معاملة قطع الـDNA المراد توسيمها بالإنزيم Alkaline-phosphatase لنزع مجموعة الفوسفات الموجودة عند النهاية ′5 وترك مجموعة الهيدروكسيل (OH) حرة، ثمّ يستعمل الإنزيم Polynucleotide kinase لاستبدال مجموعة الهيدروكسيل بمجموعة فوسفات مُعلّمة إشعاعياً وإعطاء حامض نووي له خاصية إشعاعية طرفية منخفضة (شكل 4 – 2).



شكل (4 – 2). توسيم طرف الـDNA باستعمال إنزيم
الـPolynucleotide kinase (PNK)

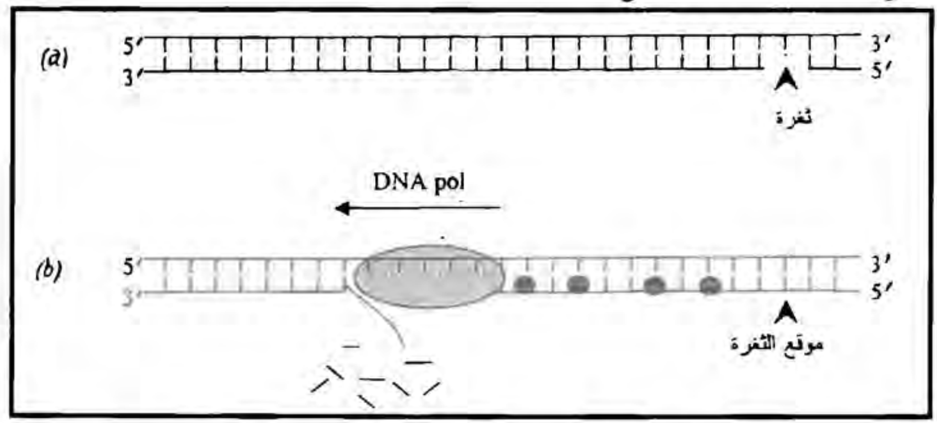
(a)نزع مجموعة الفوسفات من الـDNA بإضافة إنزيم الـPhosphatase لتتكوّن مجموعة الهيدروكسيل (5′– OH).

(b)تنقل ذرة الفوسفات الطرفية المُشعّة ATP (α-^{32}P) المشار إليها بالدائرة السوداء إلى النهاية 5′ بوساطة إنزيم PNK (يمكن أن يحدث ذلك بوساطة تفاعل تبادلي مع النهايات الطرفية 5′-phosphate).

ترجمة الثغرة Nick translation:

تعتمد هذه الطريقة على قدرة إنزيم البلمرة DNA polymerase Iعلى ملء الثغرات المتكوّنة على محور الفوسفات ثنائية الأستر (Phosphodiester) للـDNA، وقد تتكوّن هذه الثغرات إما طبيعياً أو بإضافة تراكيز منخفضة من الإنزيم DNase I في محلول التفاعل مكوّناً نهايات حرة هيدروكسيلية (3′– OH) وفسفورية (5′– phosphoryl)، وعند إضافة إنزيم البلمرة فإنه يُحفّز عملية إحلال النيوكليوتيدات المفقودة وبناء الأطرف الحرّة، وذلك بإدخال مجموعات من dNTPs

فإذا كانت واحدة منها مُعلّمة سيكون الـDNA الناتج موسوماً بالعنصر المُشع بحيث يمكن الاستدلال عليه (شكل 4 – 3).



شكل (4 – 3). توسيم الـDNA بطريقة ترجمة الثغرة

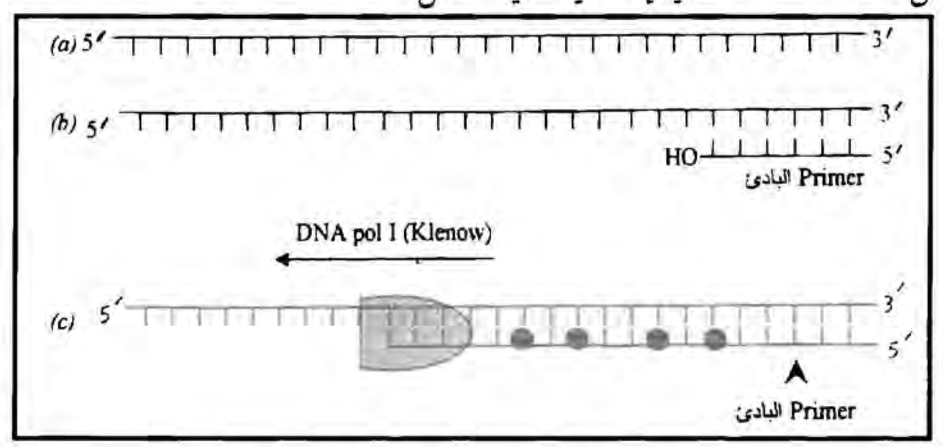
(a) يتم تكوين شريط مفرد وذلك بتكوين ثغرة في محور روابط الفسفور ثنائية الأستر باستعمال الإنزيم DNase I.

(b) يصنع إنزيم الـDNA pol (DNA polymerase) شريط مفرد مقابل للشريط القالب (الأعلى) ويعمل في الوقت نفسه على تحليل الشريط غير القالب (الأسفل) في الاتجاه 3′→5′ وفي حالة توفر العنصر المُشع (α-^{32}P) في الـdNTP المضافة في محلول التفاعل لتكوين شريط جديد مُشع بفعل الـdNTP الداخلة في تركيبه (الدوائر السوداء).

التوسيم بإطالة البادئ Labeling by primer extension:

تعتمد هذه الطريقة على استعمال سلاسل نيوكليوتيدات قصيرة (Oligonucleotides) كبادئ لبناء شريط الـDNA بمساعدة إنزيم الـ DNA polymerase. ولكي يتم توسيم الـDNA فلا بُدّ من فتحه بالحرارة، إذ تلتحم البوادئ النيوكليوتيدية مع الأشرطة الأحادية للـDNA، ومن ثم تعمل قطعة كلينو Klenow fragment (وهي جزء من إنزيم بلمرة الـDNA لها القدرة على إضافة نيوكليوتيدات لسلسلة الـDNA النامية) بتكوين نسخة من القالب ابتداءً من مجموعة 3′- OH في

سلسلة النيوكليوتيدات القصيرة، فإذا ما تم إدخال مجموعة مُشعّة من dNTP فسينتج عن ذلك DNA له خاصية إشعاعية عالية (شكل 4 – 4).



شكل (4 – 4). توسيم الـDNA بإطالة البادئ

(a) يفتح الـDNA ليعطي جزيئات من الأشرطة المفردة.

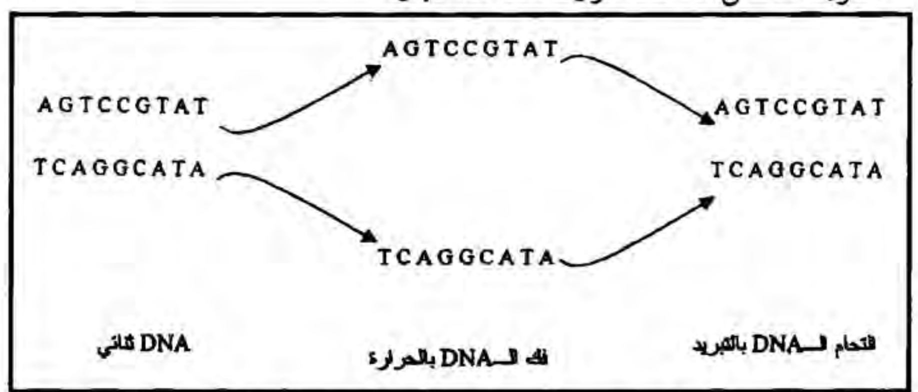
(b) تضاف النيوكليوتيدات القصيرة كبادئ لتكوّن منطقة قصيرة من الشريط المزدوج لها مجموعة OH –′3 حرة.

(c) تقوم قطعة كلينو بتصنيع نسخة من الشريط القالب ابتداءً من طرف OH –′3 للبادئ بإضافة dNTP (α-^{32}P) المُشار إليها بالدوائر السوداء لتُعطي جزيئات DNA عالية الإشعاع.

التهجين الجزيئي للـDNA:

إن الطبيعة التكاملية لقواعد الـDNA هي إحدى المظاهر المهمة التي يمكن استغلالها في الهندسة الوراثية، فإذا تم تسخين حلزون الـDNA فإن الجديلتين تنفصلان عن بعضهما البعض، ومن الممكن إعادتهما إلى حالتهما الطبيعية بالتبريد (شكل 4 – 5). يمكن الاستفادة من هذه الخاصية للحصول على المعلومات المتعلّقة بتعقيد تركيبة تسلسل الـDNA، كما هو الحال في معرفة طبيعة الـDNA لحقيقيات النواة على النحو الآتي:

* بعض الـDNA يكوّن عروات مزدوجة لاحتوائها على تسلسلات تسمّى بالمتكررات العكسية (Inverted repeats) أو البالندرومية (Palindromes) والتي تنثني على بعضها مكوّنةً تراكيب تُشبه مشبك أو دبوس الشعر، وهذا ما يُسمّى بالـDNA المعقوف (Foldback DNA).
* تسلسلات عالية التكرار (Highly repetitive) وهي الثانية في سرعة إعادة الالتحام وتوجد لمرّات عديدة في الجينوم.
* تسلسلات معتدلة التكرار (Moderately repetitive).
* التسلسلات المتميّزة أو ذات النسخة المفردة التي نادراً ما تلتحم مرة أخرى مع الشريط المُكمّل لها تحت ظروف هذا الاختبار.



شكل (4 – 5). أساس تهجين الـDNA

هنالك طريقة أخرى حساسة جداً لالتقاط تسلسل مُعيّن من خليط الـDNA، وهي استعمال تسلسل نقي وموسوم بالعنصر المُشع ^{32}P كمجس، إذ يفتح (يُمسخ) هذا المجس ليتكامل تسلسله مع تسلسل الـDNA المُستهدف.

يتم تفريد (فصل) الـDNA المراد تهجينه، ثمّ يُثبّت على غشاء النيتروسليلوز أو النايلون، وتُجرى عملية التهجين عند درجة حرارة 65 – 68°م لعدّة ساعات للسماح لعملية التكامل، ثمّ تُغسل الزيادة من المجس، ومن ثمّ تُقاس درجة التهجين بقياس درجة الإشعاع أو بتحضير الصورة الإشعاعية، إذ تُعرّض العينة لفلم حسّاس لأشعّة أكس، وسيتم مناقشة ذلك في الموضوعات اللاحقة.

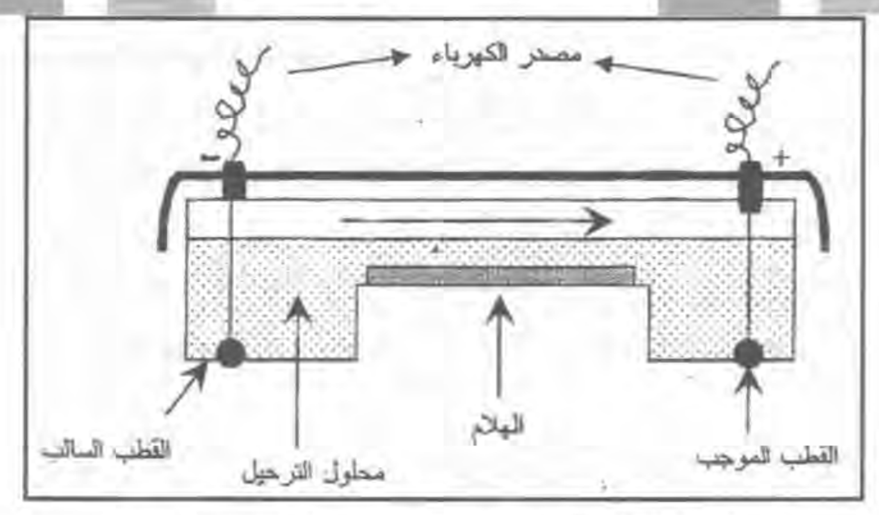
الترحيل الكهربائي الهُلامي:

يُعدّ الترحيل الكهربائي من الإجراءات المهمّة في مجال الهندسة الوراثية، إذ يمثّل الطريقة المُثلى لملاحظة أجزاء الـDNA مباشرةً، وتستند فكرة ذلك على أن الأحماض النووية عبارة عن مُركّب أيوني سالب الشحنة في الوسط المُتعادل نتيجةً لوجود مجاميع الفوسفات على محور الفوسفات ثنائي الأستر، وهذا يعني أنه عندما توضع جزيئات الأحماض النووية في مجال كهربائي فإنها سوف تُهاجر من القطب السالب ناحية القطب الموجب.

يُستعمل لهذا الإجراء طبقة من الهُلام تعمل على فصل جزيئات الأحماض النووية بناءً على أحجامها بمساعدة جهاز الترحيل الكهربائي، إذ يستعمل نوعين من الهُلام، وهما هُلام الأجاروز (Agarose) وهُلام متعدد الأكريل أمايد (Polyacrylamide). إذ يُستخلص الأجاروز من الأعشاب البحرية ويُباع على هيأة مسحوق تتم إذابته في المحاليل المتعادلة بتراكيز مُلائمة تتراوح بين 0.3 – 2٪ (وزن/ حجم) ويتصلّب بالتبريد ليكوّن الهُلام، ويستعمل لذلك أوعية خاصة (شكل 4 – 6). أما هُلام الأكريل أمايد فإنه يستعمل لفصل الجزيئات الصغيرة للـDNA في بعض الاستعمالات مثل قراءة تسلسل الـDNA أو فصل الحُزم البروتينية، لأن ثقوبه أصغر من ثقوب هُلام الأجاروز. ويوضّح الجدول (4 – 1) معدّل الفصل لجزيئات الحامض النووي في كل من هُلامي الأجاروز والأكريل أمايد .

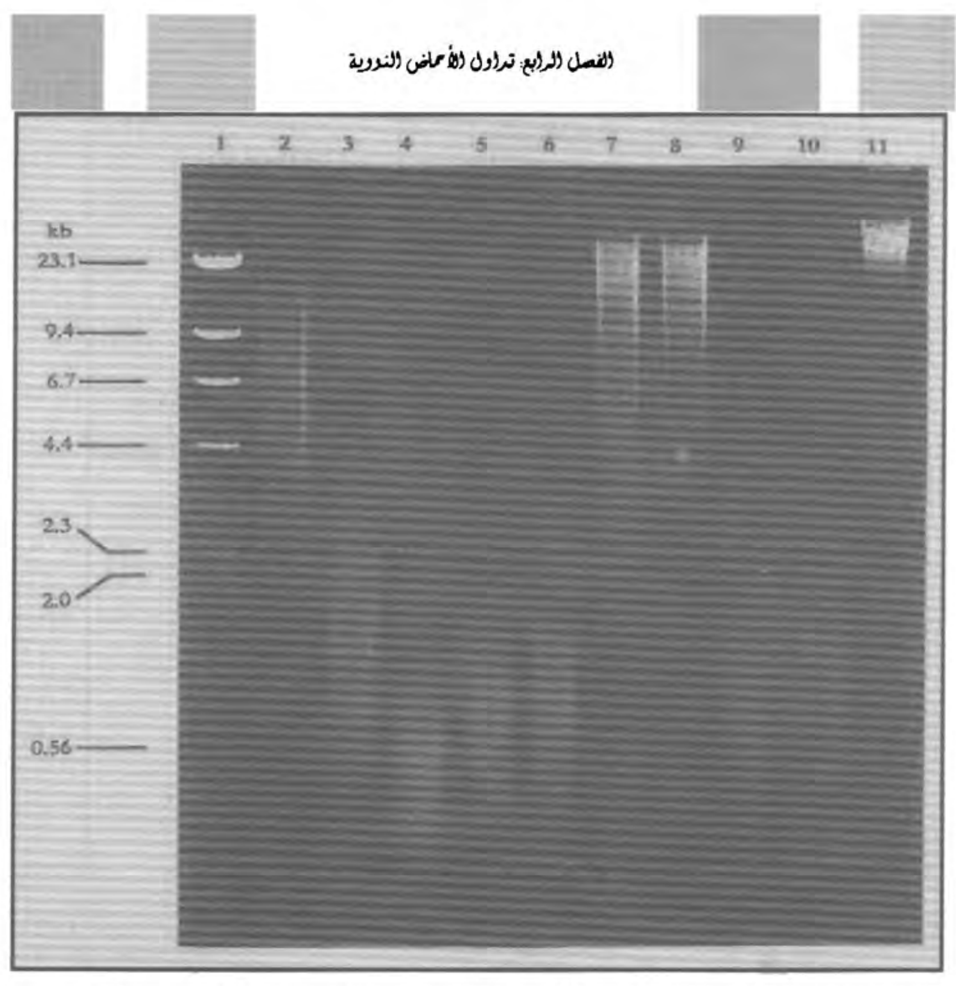
جدول (4 – 1). مواصفات الفصل لهُلامي الأجاروز والأكريل أمايد

نوع الهُلام وتركيزه	مدى الفصل (زوج قاعدي)
0.3٪ أجاروز	1000 – 50000
0.7٪ أجاروز	300 – 20000
1.4٪ أجاروز	300 – 6000
4٪ أكريل أمايد	100 – 1000
10٪ أكريل أمايد	25 – 500
20٪ أكريل أمايد	1 – 50



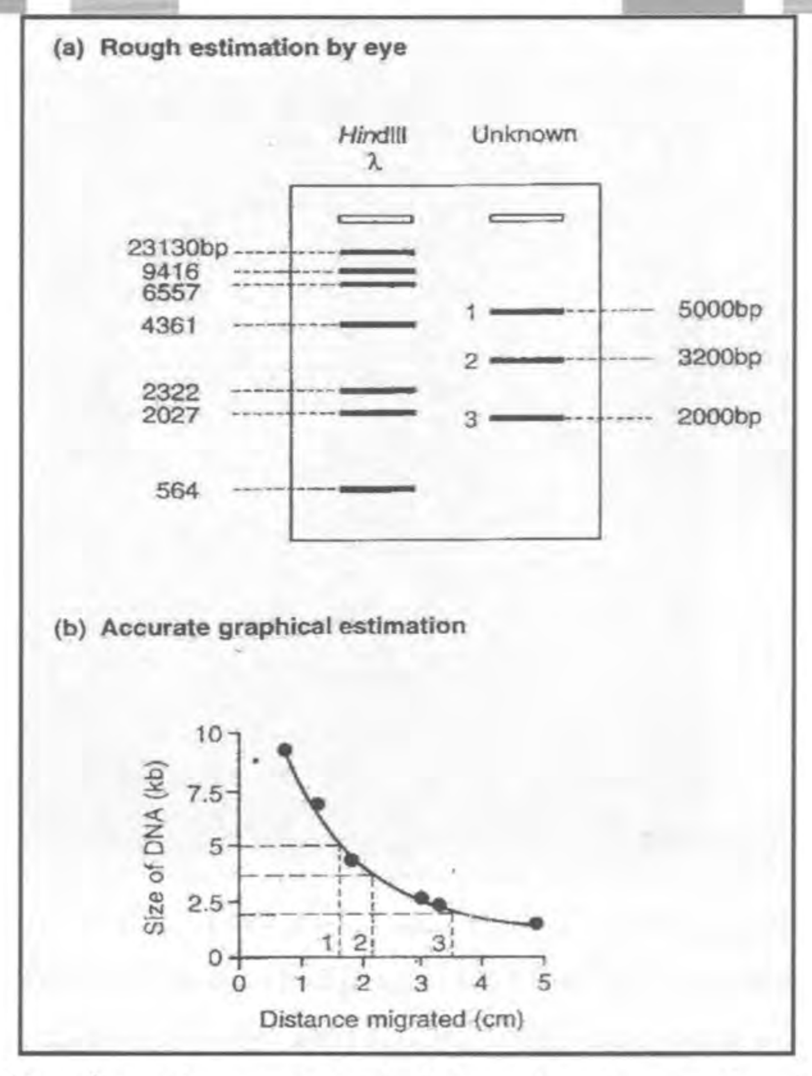
شكل (4 – 6). الجهاز النموذجي المستعمل في الترحيل الكهربائي
يُغطّى الهُلام بالمحلول المنظّم (Buffer)، ولهذا يُسمّى في بعض الأحيان بهُلام الأجاروز الغاطس SAGE (Submerged agarose gel electrophoresis).
توضع عينات الأحماض النووية في حُفر الهُلام، ومن ثمّ تُرحّل باتجاه القطب الموجب كما هو مُشار إليه بالسهم الأفقي.

يتم الترحيل الكهربائي بوضع عينات الحامض النووي في حُفر عند إحدى نهايتي الهُلام ثمّ يُمرر تيار كهربائي إلى أن تصل صبغة التحميل الدالّة (صبغة البروموفينول الزرقاء Bromophenol blue المُضافة إلى العينة قبل ترحيلها) بالقرب من النهاية الأخرى. هذا ويمكن تحديد الأحماض النووية بإضافة بروميد الإثيديوم (Ethidium bromide) ثمّ تُفحص بتعريضها للأشعة فوق البنفسجية، إذ تظهر على هيأة حُزم برتقالية اللون يمكن تصويرها ودراستها (شكل 4 – 7). ويمكن تقدير أحجام القطع المجهولة برسم مُنحنى مُعايرة (Calibration curve) للعينة القياسية (المُكوّنة من قطع DNA معلومة الحجم الجزيئي مثل الفاج لامدا المُقطّع بأحد الإنزيمات القاطعة)، علماً بأن ارتحال القطع يتناسب عكسياً مع لوغاريتم العدد 10 لعدد الأزواج القاعدية، (شكل 4 – 8)، إذ يُفيد هذا الإجراء فيما يُعرف بخريطة التقطيع الإنزيمي (Restrictinon mapping). كما أنه يستعمل بصورة تقليدية في تحليل ودراسة البروتينات.



شكل (4 – 7). صورة هلام الأجاروز مصبوغ بمادة بروميد الإثيديوم ومُعرّض للأشعة فوق البنفسجية، إذ تظهر عينات الـDNA على هيأة حُزم برتقالية

الحُزم الموجودة في المجال 1 تمثّل DNA الفاج لامدا (كدليل حجمي) مقطوع بالإنزيم *Hin* dIII مع الإشارة إلى أحجام القطع بالكيلو زوج قاعدي (Kb). أما المجالات الباقية فهي تحتوي على عينات DNA قطّعت بإنزيمات مختلفة، ونظراً للطبيعة المختلفة للعينات، فقد تباين نمط الهجرة لها، وظهرت على هيأة مسحات طويلة (Smears) على الهلام، فالعينات التي قطعت مسافة أطول في المجالات 3 ، 4 ، 5 ، 6 ، 9 ، 10 تتكوّن من قطع DNA أصغر في الحجم الجزيئي مقارنةً بالعينات التي بقيت قريبة من الحُفر التي وُضعت فيها العينات في المجالات 2 ، 7 ، 8 ، 11.



شكل (4 – 8). تقدير الحجم الجزيئي لقطع الـDNA بعد ترحيلها على هُلام الأجاروز

(a) تقدير تخميني بالاعتماد على النظر.

(b) تقدير دقيق بالاعتماد على منحنى قياسي تمّ رسمه على ضوء الأحجام الجزيئية لقطع الفاج لامدا (بعد تقطيعه بالإنزيم *Hin* dIII) والمسافة التي قطعتها تلك القطع في الهلام.

دراسة تسلسل الـDNA (DNA sequencing):

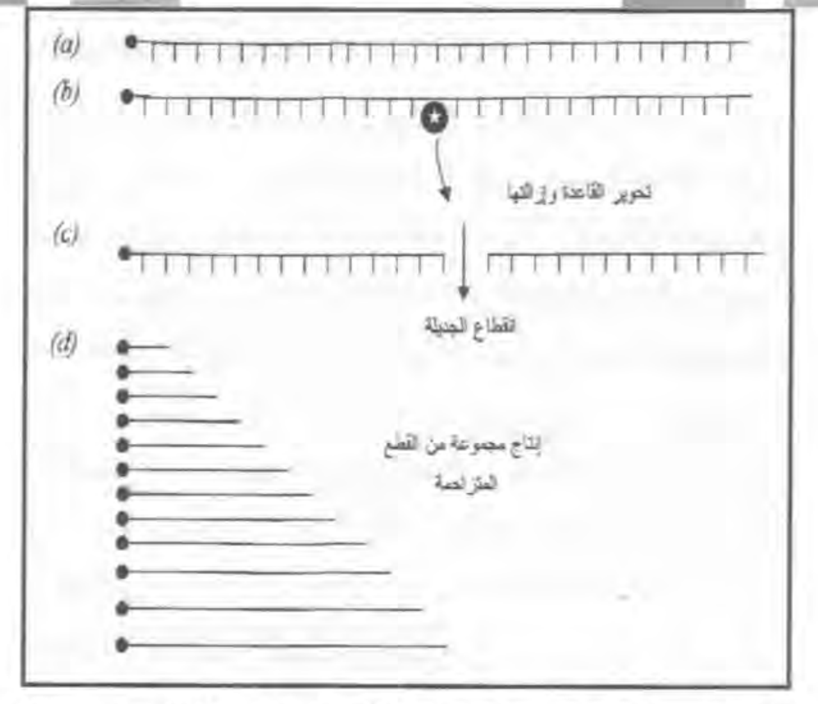
إن القدرة على تحديد تسلسل القواعد في الـDNA هي الأساس المهم في علم الأحياء الجزيئي لما توفّره من معلومات متقدمة عن تركيب الـDNA التي أدّت إلى تسارع التجارب وتطويرها مع نهاية السبعينات، إذ توجد لذلك طريقتان رئيسيتان:

الأولى، صمّمها كل من Walter Gilbert و Allan Maxam، إذ يستعمل فيها مواد كيمياوية تُقطّع الـDNA، وتُكوّن قطع تختلف عن بعضها بفارق نيوكليوتيدة واحدة.

أما **الثانية**، فقد صمّمها Fred Sanger و Alan Coulson، وهي تتضمّن استعمال إنزيم يستنسخ أشرطة الـDNA. ورغم تشابه الطريقتين من ناحية تحليل القطع والترحيل الكهربائي والتصوير الإشعاعي، لكن الطريقة الإنزيمية هي الأكثر شيوعاً.

طريقة Maxam – Gilbert الكيمياوية:

تعتمد هذه الطريقة على تكسير خيط الـDNA بشكل مدروس، إذ تتم هذه العملية باستعمال مواد كيمياوية تعمل بشكل خاص على القواعد النيتروجينية، إذ إن كل مجموعة من تلك المواد تؤدي إلى تكسير الـDNA عند نوع مُعيّن من القواعد، بحيث ينتج عن ذلك خليط من الخيوط المختلفة بأطوالها بمقدار نيوكليوتيدة واحدة فقط. إن عملية القطع تتم على مرحلتين، ففي الأولى تُضاف مادة كيمياوية تعمل على تحوير نوع مُعيّن من القواعد النيتروجينية، وفي الثانية تُضاف مادة كيمياوية تؤدي إلى قطع خيط الـDNA في ذلك الموقع المُحوّر، فمثلاً تعمل مادة الـDimethyl sulfate على تحوير القاعدة G من خلال إضافة مجموعة مثيل إلى الموقع N7 لهذه القاعدة، وعند ذلك سيكون من المُمكن كسر خيط الـDNA عند هذه القاعدة المُحوّرة بفعل مادة ثانية (تعمل على قطع الشريط) وهي الـPiperidine وهكذا لبقية أنواع القواعد النيتروجينية الأخرى، ولكن باستعمال مواد مُحوّرة وقاطعة أخرى (شكل 4 – 9).



شكل (4 – 9). دراسة تسلسل الـDNA بطريقة Maxam – Gilbert

(a) إنتاج شريط مفرد مُعلّم بالعنصر المُشع.

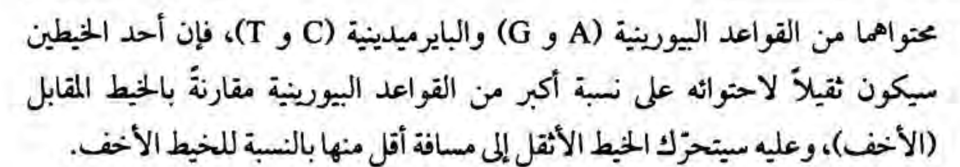
(b) تحوير وإزالة قواعد الـDNA كيميائياً بمعدل قاعدة واحدة في الجزيء الواحد.

(c) كسر محور الفسفور ثنائي الأستر باستعمال الـPiperidine.

(d) إنتاج مجموعة من قطع الـDNA مختلفة الطول (بواقع نيوكليوتيدة واحدة) مُعلّمة في الطرف '5.

إذ تتم الطريقة وفق السياق الآتي:

1. تعليم قطعة الـDNA تحت الدراسة بإضافة مجموعة فوسفات مؤشرة بـ^{32}P إلى الطرف '5 لكل من خيطي حلزون الـDNA.
2. فصل خيطي الـDNA عن بعضهما بإضافة مادة DMSO (Dimethyl sulphoxide) والتسخين إلى درجة حرارة 90°م، إذ يؤدي ذلك إلى كسر الأواصر الهيدروجينية.
3. تُرحّل الأشرطة المفردة الناتجة على هُلام متعدد الأكريل أمايد لفصل خيطي الـDNA ومن ثمّ الحصول على أحدهما بصورة نقيّة. وبما أن الخيطين يختلفان عن بعضهما من حيث



محتواهما من القواعد البيورينية (A و G) والبايرميدينية (C و T)، فإن أحد الخيطين سيكون ثقيلاً لاحتوائه على نسبة أكبر من القواعد البيورينية مقارنةً بالخيط المقابل (الأخف)، وعليه سيتحرّك الخيط الأثقل إلى مسافة أقل منها بالنسبة للخيط الأخف.

4. تُستخلص حُزمة الخيط الثقيل من الهُلام وتُقسم إلى أربعة أجزاء.

5. يُستعمل كل جزء لتحديد مواقع نوع مُعيّن من القواعد، فمثلاً يستعمل الجزء الأول لتحديد موقع كل G من خلال إضافة مادة كيمياوية مُحوّرة ومادة أخرى تُقطّع الخيط عند ذلك الموقع المُحوّر (إن ظروف التفاعل يجب أن تُضبط بحيث لا يزيد عدد الكسور في الخيط عن كسر أو كسرين فقط)، إذ ينتج عن ذلك مجموعة من الخيوط مختلفة في الأطوال وتنتهي كلّها بالقاعدة G عند الطرف ′3. تُكرر العملية مع الأجزاء الثلاثة الباقية باستعمال مواد مُحوّرة وقاطعة خاصة بكل قاعدة، إذ تتكوّن مجموعة من خيوط الـDNA مختلفة في الأطوال وتشترك بنفس النيوكليوتيدة عند الطرف ′5 (المُعلّم شعاعياً) ولكنها تختلف عند الطرف ′3.

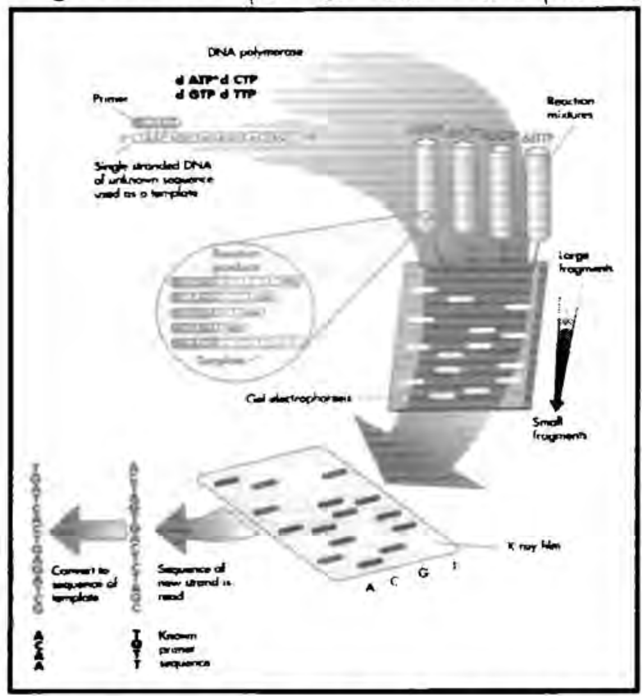
6. تُفصل الخيوط المفردة لكل تفاعل على هُلام متعدد الأكريل أمايد، ويتم تحديد مواقع الحُزم المُشعّة بوساطة التصوير الإشعاعي الذاتي.

طريقة Sanger – Coulson الإنزيمية:

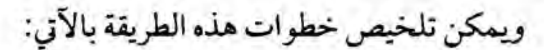
تُسمّى هذه الطريقة أيضاً بطريقة إيقاف السلسلة (Chain termination method) أو يُطلق عليها Dideoxy ويُشترط فيها كون قطعة الـDNA المرغوب معرفة تسلسلها على شكل خيط مفرد لكي تستعمل بمثابة قالب لتصنيع الخيط الثاني بوساطة إنزيم بلمرة الـDNA، لذلك يتم كلونة الـDNA تحت الدراسة في أحد النواقل المُشتقّة من الفاج M13.

يقوم إنزيم بلمرة الـDNA بتخليق خيط جديد مُكمّل للخيط المُكلون، وفضلاً عن قابلية الإنزيم على إضافة النيوكليوتيدات الاعتيادية فإنه من الممكن أن يُضيف مشابهات النيوكليوتيدات (2, 3, dideoxynucleoside triphosphates) التي تفتقر إلى مجموعة الهيدروكسيل في الموقع ـ3 للسكر الخماسي، لذلك فإن إضافة تلك المشابهات سوف يؤدي إلى إيقاف نمو سلسلة الـDNA الجديدة بسبب تعذّر إضافة النيوكليوتيدات إلى طرفها الخالي من مجموعة OH –′3.

بعد ارتباط البادئ بالمنطقة المجاورة للـDNA المُكلون تبدأ عملية تصنيع الخيط الجديد بوساطة قطعة كلينو (Klenow fragment) لإنزيم البلمرة DNA polymerase I (قطعة كلينو هي الجزء المسؤول عن تصنيع خيوط الـDNA في جزيئة الإنزيم، أما الجزء الآخر من الإنزيم فيكون مسؤولاً عن تحطيم الـDNA) (شكل 4 – 10).



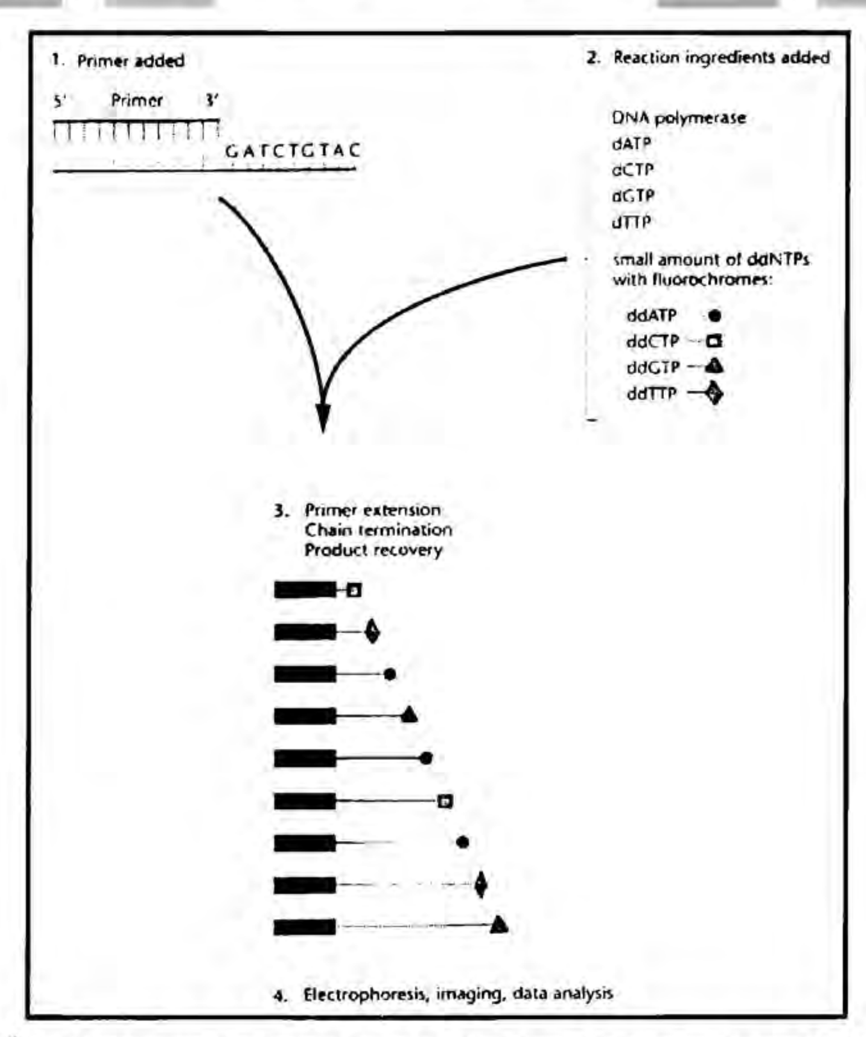
شكل (4 – 10). دراسة تسلسل الـDNA باستخدام طريقة Dideoxy
يُضاف البادئ المُعلّم إلى DNA مفرد الشريط غير معروف التسلسل. يعمل إنزيم DNA polymerase على إضافة القواعد الحرة إلى الشريط المفرد بالاعتماد على أساس التزاوج القاعدي المكمّل. تتم أربعة تفاعلات مختلفة، كل واحد يُضاف إليه Dideoxynucleotude مناظرة (ddATP ، ddCTP ، ddGTP ، ddTTP)، وهذه تعمل على إنهاء تسلسل الـDNA حينما يتم إدغامها بدل القاعدة الاعتيادية deoxynucleotide (dATP ، dCTP ، dGTP ، dTTP)، والتي تناظر القواعد A ، C ، G ، T على التوالي). ينتج عن ذلك قطع متغايرة بالطول يمكن فصلها بالترحيل الكهربائي. إن موقع كل قطعة يتم تحديده بوساطة انبعاث جسيمات مُشعّة من إحدى القواعد المُعلّمة.



ويمكن تلخيص خطوات هذه الطريقة بالآتي:

1. كلونة قطعة الـDNA المرغوب دراسة تسلسلها في الفاج M13 وإضافة بادئ مُكمّل للطرف '3 لتلك القطعة.
2. إضافة الأنواع الأربعة من النيوكليوتيدات: dATP ، dTTP ، dGTP ، dCTP ، ولا بُدّ من كون واحدة أو أكثر منها مُعلّمة إشعاعياً مثل استعمال النيوكليوتيدة المُشعّة $[\alpha\text{-}^{35}S]$dATP التي تعطي نتيجة أدق من استعمال الفسفور المُشع ^{32}P.
3. تقسيم الخليط إلى أربعة أنابيب بحيث يُضاف لكل أنبوبة إحدى مُشابهات (مُناظرات) النيوكليوتيدات. فمثلاً يُضاف للأنبوبة الأولى ddATP والثانية ddCTP والثالثة ddGTP والرابعة ddTTP. إن إضافة هذه المُشابهات يعمل على إيقاف بناء السلسلة، فإذا كانت الأنبوبة الأولى محتوية على ddATP فإن إنزيم البلمرة سيضيف dATP أو ddATP مقابل كل T في القالب، إذ يؤدي ذلك إلى استمرار التصنيع في الحالة الأولى، وإيقافه في الحالة الثانية، وينتج عن هذا تكوين خليط من خيوط DNA جديدة مُشعّة وذات أطوال مختلفة تنتهي بـddATP عند الطرف '3، وهكذا في الأنابيب الثلاث الباقية. وبهذا سينتج خليط من خيوط الـDNA المختلفة الأطوال والتي تحتوي جميعها على نفس النيوكليوتيدة في الطرف '5 ولكنها تختلف في الطرف '3.
4. تُفصل الخيوط الناتجة لكل تفاعل من التفاعلات الأربعة بوساطة ترحيلها كهربائياً في هُلام متعدد الأكريل أمايد المُحضّر بتركيز يسمح بفصل حُزم الـDNA المُصنّعة حتى لو كانت مختلفة بمقدار نيوكليوتيدة واحدة.
5. يتم تحديد مواقع الحُزم في الهُلام بطريقة التصوير الإشعاعي الذاتي Autoradiography. هذا ويتم جمع المعلومات ودراستها عن طريق الكومبيوتر الذي يُنجز بعض التحليلات كترجمة تسلسلات الأحماض الأمينية والتعرّف على مواقع القطع والمناطق المتشابهة في التسلسلات، وكذلك التراكيب المهمة الأخرى كالحفازات ومناطق السيطرة (Control regions).

وفي دراسة تسلسل الجينوم، أو بالأحرى عند دراسة تسلسلات DNA كثيرة، يتم استعمال جهاز أوتوماتيكي يعمل على تحديد تسلسل بضع مئات الآلاف في اليوم الواحد، وفي هذه الطريقة المُحوّرة عن الطريقة الأصلية أعلاه، تُعلّم الـDideoxynucleotides المناظرة بوساطة صبغات وميضية (Fluorescent dyes) (شكل 4 – 11)، لذلك فإن إنهاء السلسلة بالـA يُعلّم بلون مُعيّن. والسلسلة المُنتهية بـC تُعلّم بلون آخر، وهكذا للقواعد الأربعة. إن التفاعل هنا يتم في أنبوبة واحدة ويُحمّل أيضاً في حفرة واحدة في الهُلام، وتعمل وحدة قراءة الوميض في جهاز تحليل التسلسل على قراءة الألوان لكل حزمة وتحديدها كونها تمثل A أو T أو C أو G. تُخزن المعلومات وتُحلّل باستعمال برنامج مناسب أو تُطبع لغرض القراءة.



شكل (4 – 11). دراسة تسلسل الـDNA باستعمال dideoxynucleotides مُعلّمة بصبغات وميضية

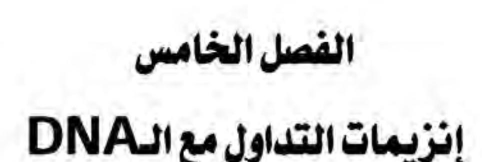
كل ddNTPs الأربع تُضاف في الأنبوبة نفسها، وخلال استطالة البادئ فإنه سيتم إنتاج كل التشكيلات. تُضاف نواتج للتفاعل في حفرة واحدة في الهُلام. وتُقرأ الحُزَم بوساطة وحدة القراءة ونظام الصورة. تُعرف هذه العملية بالأوتوماتكية والميكانيكية الروبوتية (الآلية)، وقد استعملت في مشروع جينوم الإنسان (Human Genome Project).

● = صبغة حمراء ، ■= صبغة زرقاء ، ▲= صبغة خضراء ، ◆= صبغة صفراء.

الفصل الخامس

إنزيمات التداول مع الـDNA





الفصل الخامس

إنزيمات التداول مع الـDNA

يحتاج العامل في مجال الهندسة الوراثية إلى وسائل لقطع وتوصيل وتحوير جزيئات الأحماض النووية وتعريفها، إذ يتمثّل ذلك باستعمال الإنزيمات التي سهّلت كثيراً من التعامل مع تلك الأحماض، وهي عبارة عن مواد مستخلصة من الكائنات الدقيقة المختلفة وتُزوّد الآن من الشركات المُصنّعة بشكلٍ جاهز.

إنزيمات قطع الـDNA:

تُمثّل إنزيمات قطع الـDNA إحدى أهم الوسائل التي مكّنت من سهولة التعامل مع الـDNA، وهي توجد في خلايا البكتريا كجزء من آلية وقائية تُسمّى نظام القطع والتحوير (Restriction-modification system)، إذ تعمل على تحليل أي DNA غريب يدخل الخلية، من ناحية أخرى تقوم بتحوير DNAالخلية نفسها عن طريق الميثلة (Methylation) وهي إضافة مجموعة مثيل (CH_3) لبعض القواعد في مناطق عمل الإنزيم لمنعه من قطع الـDNA الموجود أصلاً في الخلية. توجد ثلاثة أنواع من الإنزيمات القاطعة (I و II و III)، ويتميّز النوع الثاني (Type II) بأنه الأكثر استعمالاً، إذ تقطع إنزيمات هذا النوع الـDNA من الداخل، ولذلك يُطلق عليها الإنزيمات القاطعة الداخلية (Endonuclease) أو إنزيمات القطع (Restriction enzymes)، وتُعدّ المقص الجزيئي للعاملين في هذا المجال.

والجدول (5 – 1) يُبيّن أهم الفروقات بين الأنواع الثلاثة:

جدول (5 – 1). خصائص الإنزيمات القاطعة الداخلية بأنواعها الثلاثة

الخاصية	Type I	Type II	Type III
الفعاليات القاطعة والتحويرية	إنزيم مفرد ذو وظائف متعددة	إنزيمات قاطعة وإنزيمات ميثلة منفصلة	إنزيمات منفصلة ذات وحدات ثانوية في الغالب
التركيب البروتيني للإنزيم القاطع	3 وحدات ثانوية مختلفة	بسيط	وحدتين ثانويتين مختلفتين
المتطلبات للقطع	ATP، Mg^{2+}، S-adenosyle-methionine	Mg^{2+}	ATP، Mg^{2+}، وتحتاج جزئياً للمادة S-adenosyle-methionine
تسلسل المواقع المتخصصة	*Eco* B: $TGAN_8TGCT$ *Eco* K: $AACN_6GTGC$	تناظر تدويري Rotational symmetry	*Eco* P1: AGACC *Eco* P15: CAGCAG
مواقع القطع	من المحتمل عشوائية، على الأقل bp 1000 من الموقع المتخصص	عند أو بالقرب من الموقع المتخصص	24 – 26 bp إلى النهاية 3′ للموقع المتخصص
التحوّل الإنزيمي Enzymatic turnover	كلا	نعم	نعم
انتقال الـDNA (DNA translocation)	نعم	كلا	كلا
موقع الميثلة	موقع متخصص	موقع متخصص	موقع متخصص

N = أي نيوكليوتيدة.





الإنزيمات القاطعة من النوع الثاني:

تتم تسمية هذه الإنزيمات باستعمال ثلاثة حروف اعتماداً على جنس ونوع الكائن المجهري الذي تُستخلص منه، إذ يتكوّن اسم الإنزيم من الحرف الأول (يُكتب كبيراً) لاسم الجنس، والحرفين الأولين من اسم النوع (يُكتبان صغيران)، وبما أن هذه الحروف مُشتقّة من الاسم العلمي للكائن، ولذلك إما أن يوضع تحتها خط أو تُكتب مائلة. فمثلاً يُكتب الإنزيم المُستخلص من بكتريا الـEscherichia coli على النحو Eco، والإنزيم المُستخلص من بكتريا الـBacillus amyloliquefaciens على النحو Bam. وقد يُضاف رمز يدل على تسلسل الإنزيم أو سلاسة البكتريا أو صفات أخرى (جدول 5 – 2).

جدول (5 – 2). يوضح بعض الإنزيمات القاطعة والمواقع المُشخّصة وناتج القطع

	التسلسل المشخّص (موقع القطع)	الإنزيم	المصدر البكتيري
	C↓$\binom{C}{T}$CG$\binom{A}{G}$G	*Ava* I	*Anabaena variabilis*
	G↓GATCC	*Bam* HI	*Bacillus amyloliquefaciens* H
	A↓GATCT	*Bgl* II	*Bacillus globigii*
1,4	G↓AA* TTC	*Eco* RI	*Escherichia coli* RY13
2	↓CC$\binom{A}{T}$GG	*Eco* RII	*Escherichia coli* RY245
	GG↓C*C	*Hae* III	*Haemophilus aegyptius*
3	GACGC (5/10)	*Hga* I	*Haemophilus gallinarum*
	GC* G↓C	*Hha* I	*Haemophilus haemolyticus*
	GT$\binom{C}{T}$↓$\binom{A}{G}$A* C	*Hind* II	*Haemophilus influenza* Rd
	A*↓AGCTT	*Hind* III	
	GTT↓AAC	*Hpa* I	*Haemophilus parainfluenzae*
	C↓C* GG	*Hpa* II	
	GGTAC↓C	*Kpn* I	*Klebsiella pneumoniae*
	↓GATC	*Mbo* I	*Moraxella bovis*
	CTGCA↓G	*Pst* I	*Providencia stuartii*
	CCC↓GGG	*Sma* I	*Serratia marcescens*
	GAGCT↓C	*Sst* I	*Streptomyces stanford*
	C↓CCGGG	*Xma* I	*Xanthomonas malvacearum*

إن التسلسلات في الجدول أعلاه والمُتعرّف عليها من قبل إنزيمات القطع كُتبت من ′3→′5 على شريط واحد، كما أن مكان القطع قد تمّ تأشيره بسهم. القواعد التي كُتبت بين قوسين تمثّل إمكانية وجود أي من القاعدتين في موقع أو تسلسل القطع. إن القواعد المحوّرة بإنزيمات الميثلة المُناظرة تم تأشيرها بنجمة. فمثلاً A^* هي -N^6 methyladenine ، C^* هي 5-methylcytosine. إذ يوجد نوعان من تلك الإنزيمات المحوّرة وهما dam methylase وdem methylase. يُضيف الأول مجموعة مثيل إلى الموقع N^6 لقاعدة الأدنين في التسلسل A – GATC – 5 والذي يتمثّل في الموضع الحساس لبعض الإنزيمات القاطعة. ويُضيف الثاني مجموعة مثيل إلى الموقع C^5 للسايتوسين في التسلسل 3 – CCAGG – 5 أو 3 – CCTGG – 5 الذي يتمثّل في بعض المواضع الحساسة لبعض الإنزيمات أيضاً.

أما بالنسبة للأرقام 1 و 2 فإن أسماء هذين الإنزيمين شاذان، إذ إن الجينات المسؤولة عن هذين الإنزيمين ناشئة عن عوامل انتقال للمقاومة (Resistance Transfer Factors) والتي صُنّفت بشكل مستقل بالرموز RI و RII.

وفيما يتعلّق بالإنزيم *Hga*I فإن موقع قطعه يكون كالآتي:

5′GACGCNNNNN↓

3′CTGCGNNNNN NNNNN↑

إذ إن N هي أي نيوكليوتيدة، ولذلك وضع بجانبه (5/10) في الجدول أعلاه. وبالنسبة للرقم 4 في الجدول، فإنه في بعض الظروف (قلّة القوة الأيونية، الـpH القاعدي أو 50٪ جليسيرول) يُلاحظ قلّة تخصصية الإنزيم *Eco*RI وعليه تُصبح فقط الأربع نيوكليوتيدات الداخلية من التسلسل السداسي كافية للتشخيص والقطع، وهذا ما يُسمّى بفعالية النجمة $EcoRI^*$ (أو RI-star). ويتم تثبيطها بوساطة مادة Parachloromercuribenzoate، إذ تكون فعالية *Eco*RI غير حساسة لذلك. كما أن عدداً كبيراً من الإنزيمات القاطعة الأخرى تُظهر فعّالية النجمة، أي قلة التخصص تحت ظروف غير مثالية.

تتميّز هذه الإنزيمات بتخصصها العالي، إذ إن كل إنزيم يُشخّص تسلسل مُعيّن من نيوكليوتيدات الـDNA مُكوّن إما من 4 أو 5 أو 6 أزواج أو أكثر من تلك النيوكليوتيدات، وعند معاملة جزيئة DNA كبيرة بعدد من الإنزيمات القاطعة كل واحد على حدة، يُلاحظ أن عدد مرات القطع يختلف من إنزيم لآخر بسبب اختلاف تردد (Frequency) الموقع الحسّاس (موقع القطع) للإنزيمات المختلفة في تلك الجزيئة. إن تردد المواقع الحسّاسة للإنزيمات التي تتعرّف على تسلسلات رباعية هي أكثر من تردد المواقع الحسّاسة للإنزيمات التي تتعرّف على تسلسلات سداسية. وبشكلٍ عام يمكن تقدير تردد المواقع الحسّاسة للإنزيمات القاطعة في جزيئة الـDNA باستعمال المعادلة التالية على فرض توزيع هذه المواقع عشوائياً على تلك الجزيئة.

تردد الموقع الحسّاس = $(4)^n$ ، والرقم 4 يمثل القواعد الأربعة (C, G, A, T) المكوّنة لجزيئات الـDNA.

حيث إن n = عدد النيوكليوتيدات المكوّنة للموقع الحسّاس. وعليه يمكن توقّع تردد أي تسلسل رباعي بمرّة واحدة في كل $(4)^4$ = 256 bp. في حين إذا كان التسلسل سداسياً يكون تردده مرة واحدة لكل $(4)^6$ = 2096 bp. بناءً على ذلك فإن الإنزيم الذي يُميّز تسلسلاً رباعياً سوف يُنتج مقاطعاً من الـDNA أقصر منها بالنسبة للإنزيم السداسي. وهنا لا بُدّ من التنويه إلى أن المعادلة أعلاه تمثّل حساباً نظرياً لتردد مواقع القطع، وليس بالضرورة أن ينطبق ذلك على الواقع العملي.

استعمال الإنزيمات القاطعة من النوع الثاني:

تُضاف إنزيمات القطع بكميات محددة في محلول التفاعل، ثمّ يُحضن عند درجة حرارة 37°م. ويُعبّر عن النشاط الإنزيمي بالوحدات (Units) فالوحدة الواحدة من الإنزيم هي كمية الإنزيم اللازمة لقطع ميكروغراماً واحداً من الـDNA خلال ساعة واحدة عند درجة حرارة 37°م. ورغم أن أغلب التجارب قد تتطلّب هضم للـDNA بشكل تام، إلاّ أن هناك بعض الحالات قد يستعمل فيها تراكيز مختلفة من الإنزيم وأزمنة متفاوتة لإحداث هضم جزئي، اعتماداً على الهدف من التجربة.

تعتمد قطعة الـDNA التي ينتجها الإنزيم على موقع القطع، وكما لاحظنا سابقاً أن طول القطعة يعتمد على تكرار حدوث موقع القطع في تسلسل الـDNA، ويحدد طرف القطع للإنزيم نوع نهايات الجزء المقطوع، وهو مهم في الاستعمالات اللاحقة للـDNA، ويترتّب على ذلك ثلاثة أنواع محُتملة لأنواع الأجزاء المُنتجة وهي:

أ. قطع ذات نهايات مستوية (Blunt) لا توجد بها قواعد فردية حرة في نهاياتها.

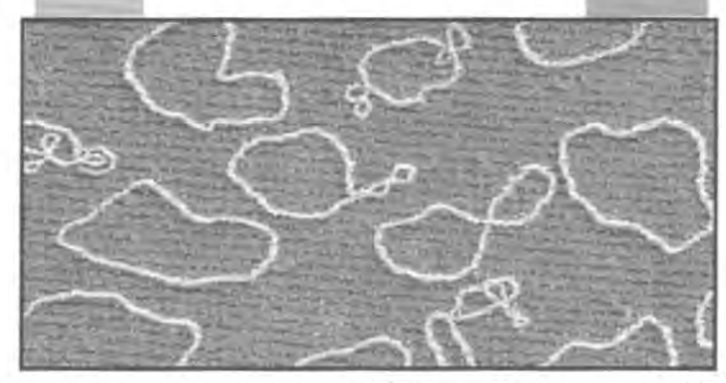
ب. قطع لها نهايات 3′ بارزة. ج. قطع لها نهايات 5′ بارزة (شكل 5 – 1).

(a)	*Hae*III	*Pst*I	*Eco*RI
(b)	5′-GGCC-3′	5′-CTGCAG-3′	5′-GAATTC-3′
(c)	GG↓CC CC↑GG	CTGCA↓G G↑ACGTC	G↓AATT CTTAA↑G
(d)	نهاية مستوية	بارزة 3′	بارزة 5′

شكل (5 – 1). أنواع النهايات الناشئة عن تأثير إنزيمات مختلفة مع تسلسل القطع وأماكن القطع موضّحة في (b) و (c) على التوالي. (d) نماذج ممثلة للنهايات الناشئة

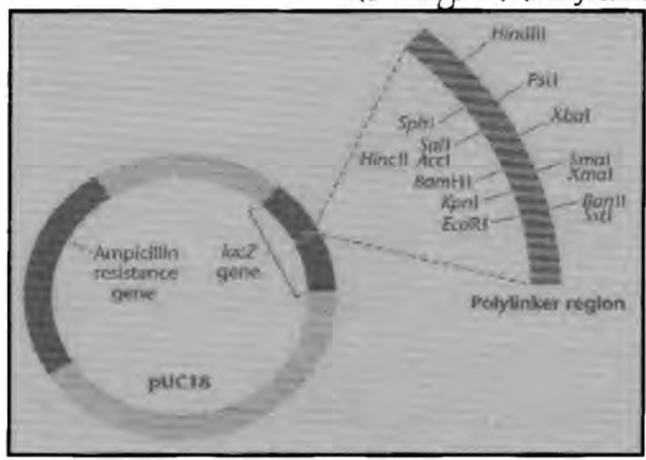
يُنتج كل من إنزيم *Pst*I والإنزيم *Eco*RI قطع بارزة (Cohesive) أو لزجة، لها قواعد فردية طرفية يمكن أن تتزاوج مع قواعد متواليات اتحادية ناتجة عن الإنزيم نفسه، ولهذا عند قطع عينتين مختلفتين من الـDNA بالإنزيم نفسه، يمكن إنتاج DNA تركيبي (مشكّل) (rDNA). ومن هذا يتبيّن أن استعمال هذه الإنزيمات يمثّل الجانب الأساسي لكثير من تطبيقات الهندسة الوراثية.

لقد تمّ هندسة أعداد كبيرة لمواقع قطع إنزيمية متفرّدة في نواقل كلونة مختلفة كالبلازميدات مثلاً (شكل 5 – 2).



شكل (5 – 2). صورة دقيقة بالمجهر الإلكتروني لجزيئات بلازميدية دائرية معزولة من بكتريا الـ*E. coli*

إذ يتم وضع مواقع القطع الإنزيمية المتفرّدة هذه على شكل تجمّع في منطقة واحدة (تجمّع عنقودي Clustered in one region) يُطلق عليه بالموقع متعدد مواقع القطع (Polylinker site) (شكل 5 – 3).



شكل (5 – 3). البلازميد pUC18

والذي يمتلك ميزات عديدة كناقل كلونة، إذ يستطيع استقبال قطع DNA كبيرة نسبياً في تجارب الكلونة، كما أنه يتضاعف بعدد كبير من النسخ، ويمتلك عدد كبير من مواقع القطع في موقع الـPolylinker تقع ضمن جين *lacZ*. إذ تعتمد عملية الانتقاء لهذا البلازميد في حالة احتوائه على قطع DNA مكلونة على أساس أن البكتريا الحاوية على بلازميد pUC18 عادي (لا يحمل قطع مكلونة) تنتج مستعمرات زرقاء اللون عند تنميتها على وسط يحتوي على مادة X-gal. وعند إدغام قطعة DNA في موقع الـPolylinker سيؤدي إلى تحطيم جين *lac Z* وتعطيل فعاليته، مؤدياً بذلك إلى ظهور مستعمرات بيضاء اللون، وبذلك يمكن وبسهولة التعرّف المباشر على المستعمرات البكتيرية التي تحتوي على بلازميدات تتضمّن قطع DNA مكلونة.

تحديد الخريطة بوساطة الإنزيمات القاطعة (Restriction mapping):

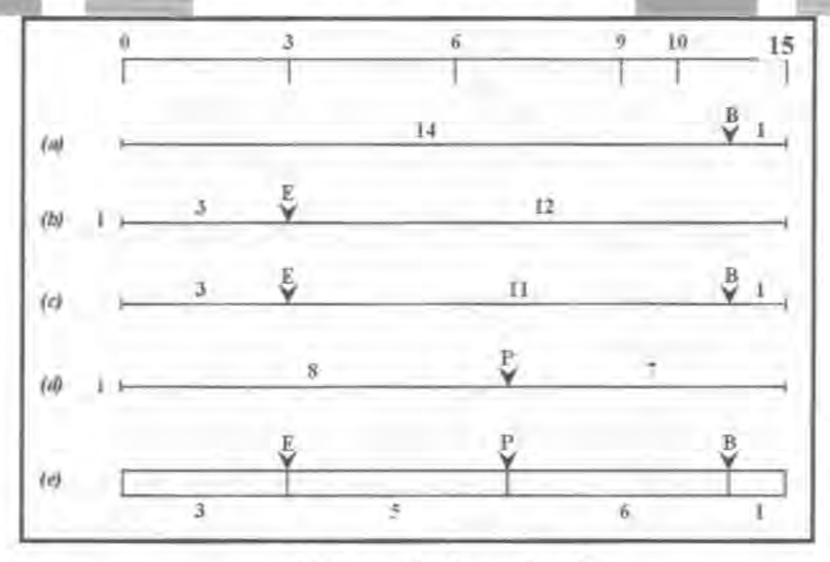
يوجد لقطع الـDNA مواقع مختلفة لتأثير الإنزيمات، وغالباً ما يكون من المفيد معرفة الموقع النسبي لهذه القطع الذي يُحدّد عن طرق التخريط الإنزيمي (Restriction mapping) وهو قطع أجزاء الـDNA بإنزيم واحد أو بمجموعة إنزيمات في آنٍ واحد، وبعد ذلك تفحص القطع الناتجة بإجراء الترحيل الكهربائي على هُلام الأجاروز وتحدّد أحجامها وتُدرس من خلال المعلومات المُتحصّل عليها كما في المثال الآتي:

لنفترض أننا نريد أن نحدد أماكن قطع الإنزيمات *Pst*I و *Eco*RI و *Bam*HI في قطعة DNA طولها 15 كيلو قاعدة (kb). إذ تُجرى لذلك عدّة خطوات من التقطيع الإنزيمي، ثمّ تُحلّل الأجزاء الناتجة وتُحدّد أحجامها كما هو مُبيّن في الجدول (5 – 3). ومن هذا يتّضح أن الهضم بكل إنزيم على حدة ينتج عنه قطعتان من الـDNA له مكان قطع واحد لكل إنزيم، وهكذا عند استعمال إنزيمين يمكن رسم الخريطة الإنزيمية الكاملة كما في الشكل (5 – 4).

جدول (5 – 3). تقطيع قطعة DNA حجمها 15 كيلوقاعدة بثلاثة إنزيمات قاطعة

*Bam*HI	*Eco*RI	*Pst*I	*Bam*HI + *Eco*RI	*Bam*HI + *Pst*I	*Eco*RI + *Pst*I	*Bam*HI + *Eco*RI + *Pst*I
14	12	8	11	8	7	6
1	3	7	3	6	5	5
			1	1	3	3
						1

ملاحظة: الأرقام المبيّنة هي الأطوال بالكيلو قاعدة (kb) للقطع الناتج عن تقطيع قطعة DNA طولها 15 كيلو قاعدة بإنزيمات *Bam*HI ، *Eco*RI ، *Pst*I إذ تم القطع بإنزيم واحد ثمّ باثنين ثمّ بالثلاثة معاً.



شكل (5 – 4). التخريط الإنزيمي

(a) عندما تهضم قطعة حجمها 15 kb بإنزيم *Bam*HI تنتج قطعتين: 14 و1 kb.

(b) القطع الناتجة باستعمال *Eco*RI: 12 و 3 kb .

(c) الهضم بالإنزيمين *Eco*RI / *Bam*HI ينتج عنه القطع 11 و 3 و 1 kb.

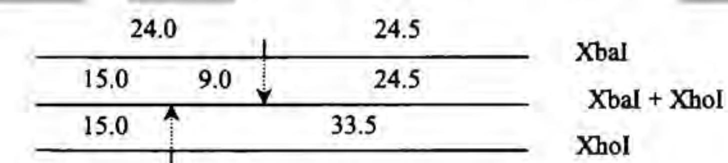
(d) تكوّن القطعتين 8 و 7 kb عند استعمال إنزيم *pst*I .

ومن ثمّ يمكن الحصول على الخريطة النهائية كما في (e).

مثال آخر:

لنفترض أننا قمنا بإجراء القطع الإنزيمي لـDNA الناقل λ الخطي، وكانت النتائج كالآتي:

الإنزيم	عدد القطع	الحجوم (kb)			
Xba I	2	24.0		24.5	
Xho I	2	15.0		33.5	
Kpn I	3	1.5	17.0		30.0
Xba I + *Xho* I	3	9.0	15.0		24.5
Xba + *Kpn* I	4	1.5	6.0	17.0	24.0



∴ الخريطة المحتملة للتقطيع بـXhoI + XbaI هي:

XhoI XbaI

15.0 9.0 24.5

بالنسبة لاحتمالات الخريطة للإنزيم KpnI هي 6 احتمالات:

1 - 1.5 17.0 30.0

2 - 1.5 30.0 17.0

3 - 17.0 1.5 30.0

4 - 17.0 30.0 1.5

5 - 30.0 17.0 1.5

6 - 30.0 1.5 17.0

ولو أضفنا نتائج القطع بالإنزيم XbaI والتي هي:

24.0 24.5

30.0 1.5 17.0

نجد أنها عند الاحتمال رقم 6 تعطي أربع قطع فعلاً بحيث تكون الخريطة للإنزيمين XbaI + KpnI هي:

XbaI KpnI

24.0 6.0 1.5 17.0

عند رسم الخريطة للإنزيمات الثلاثة تصبح:

XhoI XbaI KpnI

15.0 9.0 6.0 1.5 17.0





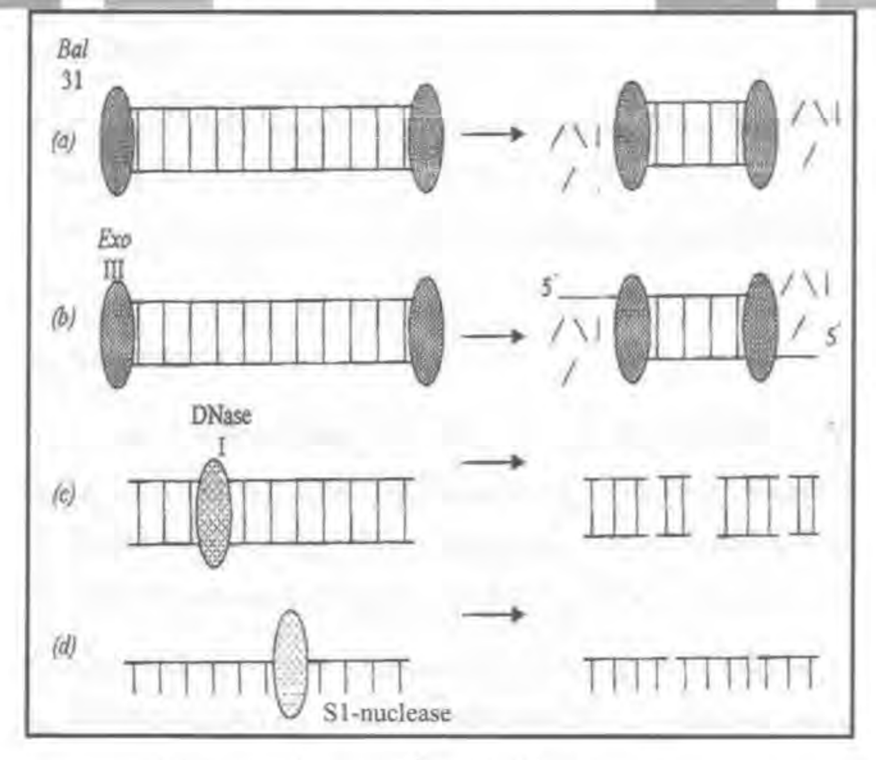
الإنزيمات المُحوّرة:

تقوم إنزيمات القطع التي وصفت في السابق والإنزيم اللاصق (DNA ligase) بوظيفة القطع واللصق المهمتين لإنتاج جزئيات الـDNA التركيبية، كما أن هناك إنزيمات أخرى تُستعمل في الهندسة الوراثية تُسمّى الإنزيمات المُحوّرة للـDNA وفيما يلي وصفها.

إنزيمات الـNucleases:

تقوم هذه الإنزيمات بتقطيع الأحماض النووية من خلال كسر الآصرة الفوسفاتية ثنائية الأستر التي تربط النيوكليوتيدات مع بعضها، مثل إنزيمات القطع الداخلية (Endonucleases) التي تقوم بالقطع خلال حلزون الـDNA، وإنزيمات القطع الخارجية (Exonucleases) التي تقطع الـDNA من الأطراف.

فضلاً عن ذلك توجد أربعة إنزيمات أخرى مستعملة في الهندسة الوراثية وهي : Bal 31 و Exonuclease III و DNase I و S1-nuclease والتي تختلف عن بعضها من حيث دقة مكان تأثيرها، لذلك فهي توفّر للمهندس الوراثي وسائل مختلفة للتعامل مع الـDNA (شكل 5 – 5).



شكل (5 – 5). طريقة تأثير بعض الإنزيمات القاطعة

(a) الإنزيم *Bal* 31 إنزيم مركّب له تأثير سريع كإنزيم 3' exonuclease مع تأثير بطيء كإنزيم Endonuclease. عندما يُضاف هذا الإنزيم بتراكيز عالية يقوم بتقصير جزيئات الـDNA من أطرافها.

(b) الإنزيم Exonuclease III هو 3' exonuclease يُنتج جزيئات لها أطراف 5'.

(c) الإنزيم DNase I يقطع الأشرطة المفردة أو الثنائية من الـDNA في مواقع عشوائية.

(d) إنزيم S1-nuclease خاص بالأشرطة المفردة سواءً DNA أو RNA.

إنزيمات البلمرة (Polymerases):

تقوم إنزيمات البلمرة بتكوين نسخ من جزيئات الحامض النووي، ويستعمل لوصف إنزيمات البلمرة الاصطلاحان: DNA-dependent أو RNA-dependent إشارةً إلى نوع القالب (Template) الذي يستعمله الإنزيم، لهذا



فإن إنزيم بلمرة الـDNA المعتمد على قالب الـDNA ينسخ DNA إلى DNA، وإنزيم بلمرة الـDNA المعتمد على قالب الـRNA ينسخ RNA إلى DNA، وإنزيم بلمرة الـRNA المعتمد على قالب الـDNA ينسخ DNA إلى RNA. وتقوم هذه الإنزيمات بتصنيع الأحماض النووية بإضافة النيوكليوتيدات ذات القواعد المُتمّمة لقواعد الشريط القالب في الاتجاه 5′→3′، ويشترط لإضافة كل نيوكليوتيدة وجود مجموعة هيدروكسيل (3′ – OH) حرة لتكوين رابطة الفوسفات ثنائية الأستر. وهذا يستدعي أيضاً وجود منطقة قصيرة من تتابع مزدوج يحتوي على مجموعة هيدروكسيل (3′– OH) حرة كبادئ لتسهيل عملية البناء.

بالإضافة إلى البلمرة يقوم الإنزيم DNA polymerase I بنشاط هدم خارجي في الاتجاهات 3′→5′ و 5′→3′ ويعمل على تنشيط تفاعل إحلال الأشرطة، إذ يعمل الجزء 5′→3′ exonuclease على تحلّل الشريط السالب، ثمّ يقوم الجزء الآخر بتصنيع النسخة الجديدة. وتقع أهم استعمالات هذا الإنزيم في عملية ترجمة الثغرة (Nick translation) للتوسيم الإشعاعي.

ويمكن كسر الإنزيم DNA polymerase I وإزالة نشاط الإنزيم 5′→3′ exonuclease المسؤول عن عملية الهدم للتسلسل في الاتجاه 5′→3′ وإنتاج ما يُعرف بقطعة كلينو (Klenow fragment) المسؤولة عن عملية البناء في الاتجاه 5′→3′ بحيث يتم استنساخ جزيء أحادي من الـDNA. ونظراً لإيقاف وظيفة الإنزيم 5′→3′ exonuclease لهذا لا يتمكّن الإنزيم من تحليل الشريط السالب للـDNA الثنائي خلال مرحلة تصنيع الـDNA الجديد، وتستعمل قطعة كلينو في التوسيم الإشعاعي بطريقة صناعة البادئ (Primer synthesis) ودراسة التسلسل بطريقة Dideoxy فضلاً عن استنساخ أشرطة الـDNA المفردة التشكيلات (Recombinants).

ويعمل إنزيم الاستنساخ العكسي RTase (Reverse transcriptase) على إنتاج DNA من RNA بدون نشاط الإنزيمات الخارجية Exonuclease التي تستعمل عادةً في استنساخ جزيئات الـmRNA لتحضير الـDNA المُكمّل (cDNA).

الإنزيمات المُحوّرة لأطراف الـDNA:

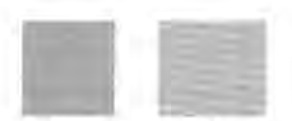
تؤثّر كل من الإنزيمات Polynucleotide kinase و Alkaline phosphatase وTerminal transferase في أطراف جزيئات الـDNA. كما هو واضح من اسم كل من الإنزيمين Kinase والـPhosphatase، فإنهما يعملان على إزالة أو إضافة مجاميع الفوسفات مثل الإنزيم البكتيري BAP (Bacterial alkaline phosphatase)، وكذلك إنزيم أمعاء العجل CIP (Calf intestinal alkaline phosphatase) اللذان يعملان على إزالة مجاميع الفوسفات من الأطراف ′5 للـDNA وترك مجموعة الهيدروكسيل (OH –′5)، ويستعمل الإنزيم لمنع التحام جزيئات الـDNA غير المرغوب فيها، أو قد يُضاف إلى النهاية ′5 للـDNA قبل إضافة الفسفور المشع مع إنزيم Polynucleotide kinase.

ويُضيف إنزيم النقل الطرفي (Terminal transferase) وبشكل مُكرّر نيوكليوتيدات إلى أي نهاية ′3 مُتاحة، إلاّ أنه يمكن لهذا الإنزيم استعمال نهايات مستوية عن طريق تعديل ظروف التفاعل. وغالباً ما يُستعمل الإنزيم لإضافة البوليمرات المتجانسة (Homopolymer) إلى جزيئات الـDNA قبل تكوين الجزيئات المُشكّلة.

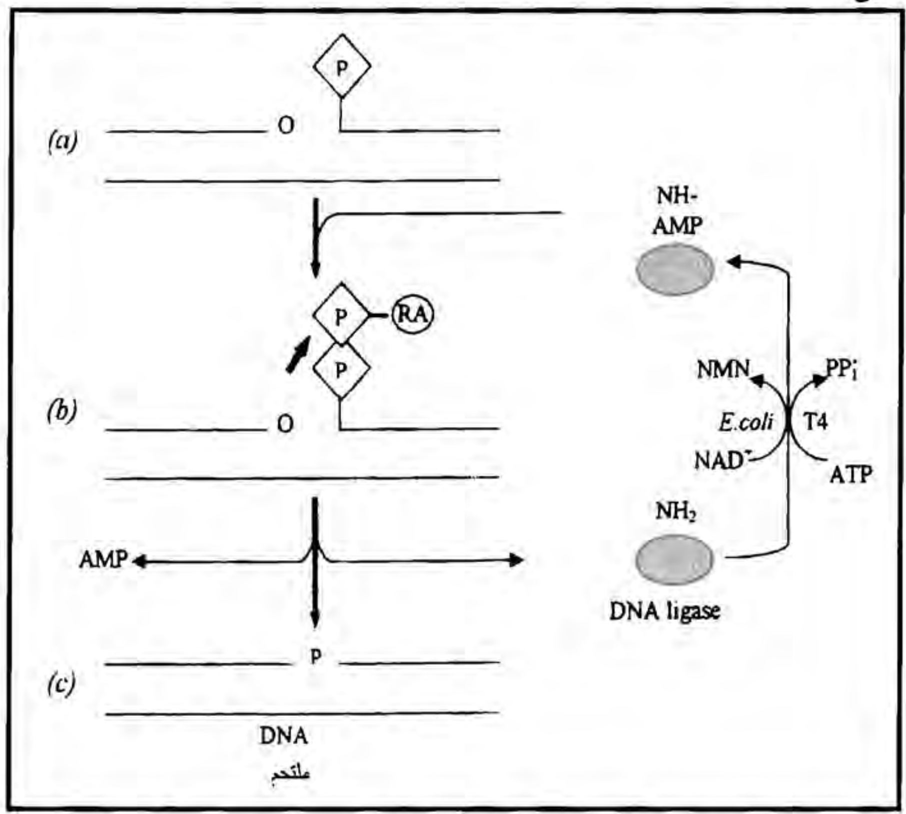
إنزيمات اللحم (اللصق):

إن الـDNA ligase هو إنزيم هام وظيفته إصلاح الأواصر الفوسفاتية ثنائية الأستر المتكسّرة إما بشكل عشوائي أو أثناء عملية تكرار الـDNA أو إعادة تركيبه، ويستعمل هذا الإنزيم عادةً في الهندسة الوراثية لغلق الثغرات المتكوّنة في سلاسل مركب السكر – فوسفات (Sugar – Phosphate) في الـrDNA، لهذا يمكن أن نعتبره لصقة جزيئية تستعمل لإلصاق قطع الحامض النووي ببعضها، وهي وظيفة مهمة في إنجاح تجارب الاستنسال (الكلونة).

والإنزيم المستعمل في التجارب غالباً هو الإنزيم T4 DNA ligase الذي يُستخلص من خلايا البكتريا *E. coli* المصابة بالفاجات البكتيرية (Bacteriophage T4)، فبالإضافة لمقدرته على قفل الفجوات في أطراف النهايات البارزة، فإنه يستعمل أيضاً لربط النهايات المستوية لجزيئات الـDNA ببعضها. ورغم أن هذا الإنزيم يعمل




بصورة جيدة عند درجة حرارة 37°م، ولكن يمكن أن يستعمل أيضاً عند درجات أقل من ذلك (4 – 15)°م، وذلك لمنع التحلل الحراري للأجزاء التي تضم النهايات البارزة لجزيئات الـDNA ببعضها. وتتضح طريقة عمل إنزيمات اللصق DNA ligase كما في الشكل (5 – 6).



شكل (5 – 6). طريقة تأثير إنزيم DNA ligase

يُلصق الإنزيم النيوكليوتيدات خلال النهايات (3′ – OH) و (5′ PO3-) القريبة من بعضها المفككة (a). تمّ أدلنة (إضافة أدينين) للإنزيم بوساطة NAD^+ (*E. coli*) أو ATP في حالة الفاج (Phage T4)، ثمّ يؤدي الإنزيم إلى تكوين الأدينين في مجموعة الفوسفات عند الطرف 5′ للرايبوز المتكوّن في الثغرة (RA تكون رايبوز – أدينين) التي تُمكّن من تكوين آصرة فوسفاتية ثنائية الأستر أثناء تكوين النيوكليوتيدات (b و c).

تتمحور أهمية الإنزيمات على قطع وتحوير وربط جزيئات الـDNA في إعطاء المهندس الوراثي المقدرة على إنتاج جزيئات الـDNA المُركّب (rDNA) داخل أنبوبة الاختبار دون الحاجة لاستعمال الكائن الحي، ولكن حالما يتم إنتاج قطع الـDNA التركيبية فإننا نحتاج بعد ذلك إلى أنظمة بيولوجية خاصة تُستعمل لإكثار جزيئات الـDNA.

الفصل السادس

لمحة عن بعض خطط الاستنسال

(الكلونة Cloning)



الفصل السادس

لمحة عن بعض خطط الاستنسال (الكلونة Cloning)

بعد اختيار مصدر المادة الأولية يتم اختيار منظومة العائل / الناقل مثل بكتريا *E. coli* التي يتوفّر عدد كبير من سلالاتها ومواصفاتها الجيدة كعائل.

وعند اختيار الناقل لا بُدّ من إنجاز أمرين مهمين وهما توصيل أجزاء الـDNA بالناقل ووسيلة لإدخال الجزيئات المشكّلة (Recombinants) في خلية العائل. ولهذا تحدد منظومة العائل / الناقل في بكتريا *E. coli* لكي تصبح مهمة اختيار منظومة الناقل ونوعية الأجزاء المستهدفة بالاستنسال ونتيجة التجربة أمراً واضحاً.

الاستنسال من الـmRNA:

على الرغم من اشتراك جميع خلايا الكائن الحي الواحد بالجينوم نفسه، فإن كل نوع من أنواع خلايا الكائنات الراقية ينتج mRNA خاصاً به، فبالإضافة إلى تعبير الجينات العامة (Housekeeping genes) اللازمة للعمليات الأيضية الأساسية لجميع الخلايا الحية، هنالك أيضاً خلايا يتم فيها تعبير جينات خاصة بنسيج معيّن، مثل خلايا الكبد وخلايا الكلية وخلايا الجلد... الخ، وكل منها تصنع بروتينات خاصة ناتج عن الـmRNA المُميّز لها.

وإضافة إلى وجود الأنماط المختلفة من الـmRNA الناتجة عن اختلاف أنواع الخلايا، فقد توجد أيضاً مجاميع مختلفة من الـmRNA متخصصة لها أهميتها في إجراء عملية الاستنسال يمكن عن طريقها عزل تسلسلات معينة موجودة في الـmRNA (جدول 6 – 1).



جدول (6 – 1). المجموعات المتوفرة من الـmRNA

المصدر	عدد جزيئات الـmRNA المختلفة	وفرة الجزيئات في الخلية الواحدة
متعدد الأدنين	9	12000
Poly (A)+RNA	700	300
من سايتوبلازم كبد الفأر	11500	15
متعدد الأدنين	1	100000
Poly (A)+RNA	7	4000
من قناة بيض الدجاج	12500	5

ملاحظة: أوجه اختلاف جزيئات الـmRNA مُشار إليها بأرقام، هناك mRNA واحد متوفر بنسبة عالية 100000 جزيء في الخلية الواحدة من خلايا قناة نقل البيض في الدجاج، وهو مسؤول عن تشفير بياض البيض (Ovalbumin) الذي يمثّل مُعظم بروتين بياض البيض.

صناعة الـDNA المُكمّل (cDNA):

من الصعب استنسال الـmRNA مباشرةً، وإنما يتطلّب تحويله أولاً إلى DNA باستعمال إنزيم الاستنساخ العكسي RTase (Reverse transcriptase) لإنتاج الـDNA المُكمّل (cDNA).

والطريقة التقليدية القديمة لصناعة الـDNA هي ربط سلسلة متعددة الأدنين Poly (A) المتقاطرة عند النهاية 3′ للـRNA ببادئ الثايمين القصير Oligo poly (dT) الذي يُنشئ مجموعة الهيدروكسيل OH –3′ التي يتطلّبها الإنزيم RTase (شكل 6 – 1). وفي حالة توفر الأنواع الأربعة من dNTPs والظروف الملائمة يصنع إنزيم الـRTase نسخة من mRNA لينتج الهجين cDNA\mRNA.

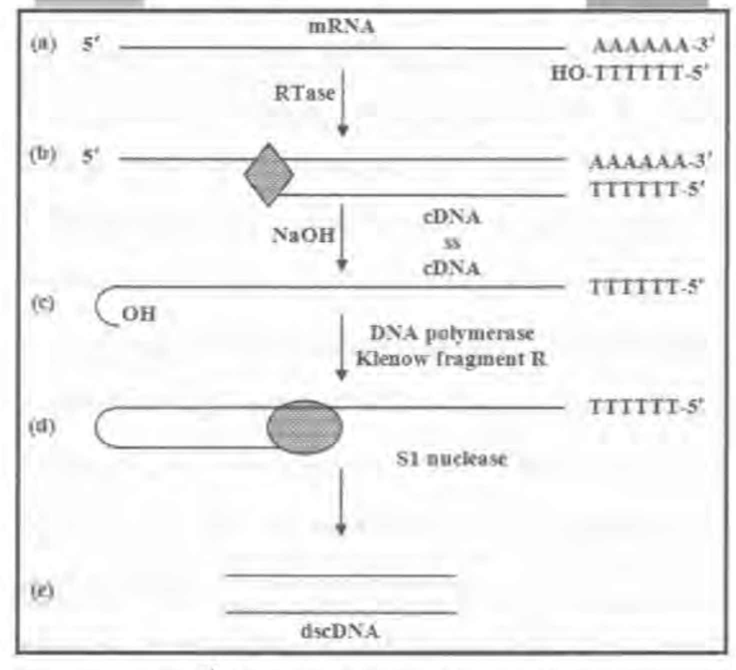
ويمكن انتزاع الـmRNA خلال عملية التحلل المائي القلوي (Alkaline hydrolysis)، ومن ثمّ يتحوّل شريط الـDNA المفرد إلى شريط مزدوج

باستعمال إنزيم البلمرة DNA polymerase، وفي هذا الشريط الثاني ينشأ البادئ ذو النهاية الهيدروكسيلية 3′ – OH بتكوين مناطق قصيرة معقوفة تُشبه دبوس الشعر في نهاية الشريط المفرد. وبعد صناعة الشريط الثاني يتشذّب هذا الشريط بوساطة الإنزيم S_1 nuclease لإنتاج جزيء مستوي الأطراف يمكن استنساله في الناقل المناسب.

هناك عدّة مشاكل قد تظهر باتّباع الطريقة المذكورة أعلاه، وهي:

1. عدم الحصول على الطول المناسب للـcDNA خاصةً إذا كان الـmRNA طويلاً نوعاً ما، وتُعدّ هذه مشكلةً كبيرة خاصةً إذا كان المطلوب هو التعبير الجيني للـcDNA، لأنه قد لا يحتوي على كل تسلسلات تشفير الجين المُستهدف.
2. هناك بعض المشاكل قد تظهر من جرّاء استعمال الإنزيم S_1 nuclease، فقد ينتزع بعض تسلسلات النهايات 5′ أثناء عملية التشذيب.

لقد تغلّبت الطرق الحديثة لصناعة الـcDNA على المشاكل السابقة إلى حدٍّ كبير، وتتضمن إحدى هذه التعديلات استعمال التذييل باستعمال قطعة السايتوسين (dC) Oligo التي تسمح بصناعة الشريط الثاني للـcDNA الناشئة على أساس بادئ الجوانين Oligo (dG) (شكل 6 – 2). وتُضاف مذيّلات السايتوسين dC إلى النهاية الطرفية 3′ للـcDNA باستعمال إنزيمات النقل الطرفي (Terminal transferase) على الأطراف 3′، وكذلك تفاعلات التذييل، ولهذا يبرز الطول الكامل للـcDNA الذي لا تنغمر فيه النهاية الطرفية 3′ بقالب الـmRNA.



شكل (6 – 1). صناعة الـDNA المُكمّل

يستعمل متعدد الأدنين الـmRNA Poly (A) كمادة بادئة.

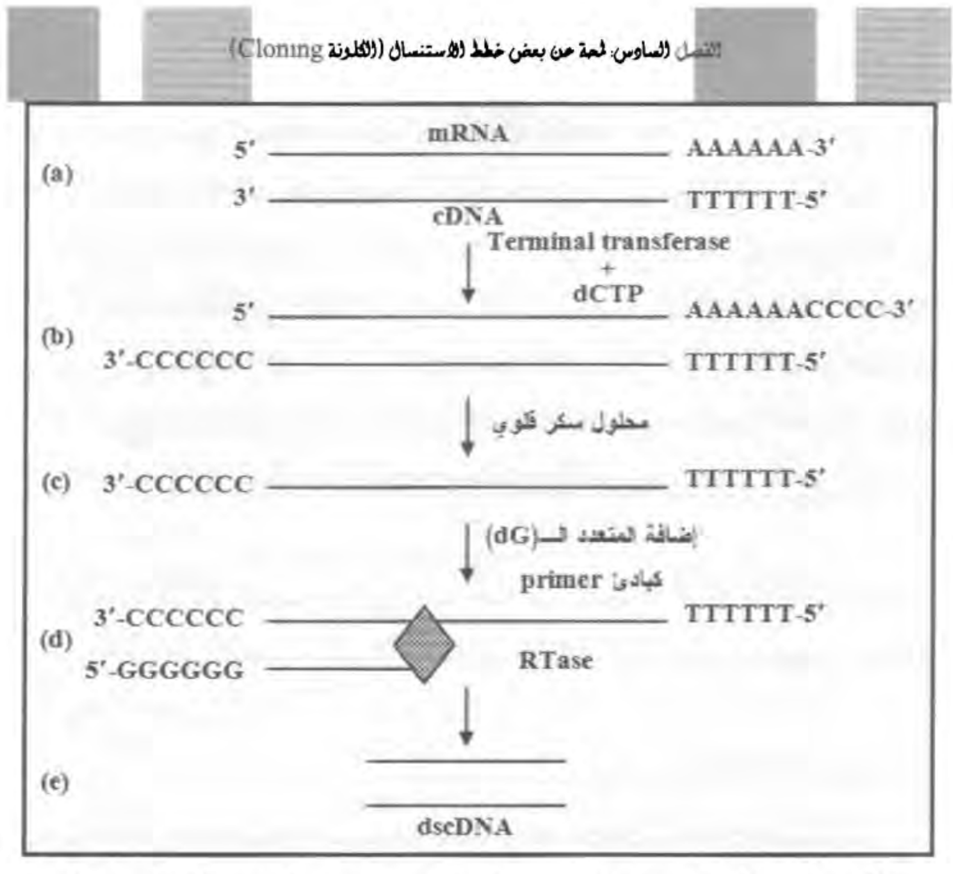
(a) ترتبط القطعة القصيرة (dT) بالذنب المتعدد (A) على الـmRNA الذي يوفّر مجموعة الهيدروكسيل OH –'3 لعملية الاستنساخ العكسي لبدء استنساخ الحامض.

(b) يُنتزع الـRNA بالتحلل المائي القلوي ليُعطي جزيء شريط مفرد من الـcDNA.

(c) شريط مفرد قصير معقوف على هيأة دبوس شعر به مجموعة هيدروكسيل OH –'3 طرفية.

(d) تصنيع شريط ثاني بمساعدة إنزيمات بلمرة الـDNA (T4 Polymerase، قطعة كلينو Klenow أو RTase).

(e) يتم تشذيب الـcDNA ثنائي الشريط بوساطة الإنزيم S_1 لإنتاج نهايات مستوية (مصمتة). وعوضاً عن الخطوة التي يستعمل بها التحلّل المائي القلوي يستعمل الإنزيم RNase H الذي يصنع شرخاً في شريط الـmRNA للهجين الـmRNA-cDNA. بوجود الإنزيم DNA polymerase I يتم تصنيع الشريط الثاني للـcDNA بوساطة ترجمة الثغرة.



شكل (6 – 2). بناء cDNA باستعمال طريقة متعددة الجوانين Oligo (dG)

(a) تكوين الشريط الأول كما هو مبين في الشكل السابق مكونة للهجين الـmRNA\cDNA.

(b) تذييل بالقاعدة سايتوسين C باستعمال الإنزيم Terminal transferase.

(c) التجزئة باستعمال محلول السكروز القلوي الذي يحلل الـmRNA ويسمح بإعادة استعمال الطول الكامل لجزيئات الـcDNA.

(d) البادئ متعدد الجوانين Oligo (dG) يلتحم بالذنب C، ومن ثمّ يستعمله إنزيم الـ Reverse transcriptase لتكوين الشريط الثاني.

(e) ينتج عنه جزيء كامل من الـcDNA ثنائي الأشرطة.

المكتبة الجينومية:

تؤدي عملية استنساخ الـDNA إلى صناعة جزيئات الـrDNA وإدغامها في نواقل بلازميدية أو فاجية يتم الاحتفاظ بها أما في خلايا بكتيرية أو في جزيئات فاجية،

وهذا ما يُطلق عليها اصطلاح بنك الاستنسال (Clone bank) أو المكتبة الجينومية (Genomic library) التي تمثّل الجينوم الكلي أو المخزون الوراثي الكامل للكائن.

والمكتبة الجينومية الجيدة يجب أن تشمل أو تمثل كامل أو غالبية الجينوم للكائن في صورة طاقم متداخل من القطع المتداخلة أُنتجت بطريقة عشوائية، ويمكن المحافظة عليها بصورة مستقرة، وعند تكوين المكتبة الجينومية يُراعى أولاً عدد النسخ المطلوبة التي يحددها حجم الجينوم، فجينوم بكتريا الـ *E. coli* يتطلب نسخاً أصغر من نسخ جينوم الإنسان مثلاً، وكذلك نوع الناقل المستعمل والذي يحدد حجم القطع المُستنسلة أيضاً.

إن عدد النسائل الممسوحة في العادة يُحدد قبل التجربة. هناك عدد من العوامل يجب أن تؤخذ بنظر الاعتبار سيتم الإشارة إليها بالمعادلة التالية والتي تستعمل لتحديد عدد النسائل، وهي كالآتي:

$$N = \ln(1 - P) / \ln(1 - f/g).$$

حيث إن N: هي عدد النسائل الممسوحة (The number of clones screened).

P: هي احتمالية عزل الجين (The probability of isolating the gene).

f: هي حجم القطعة (The fragment size).

g: حجم الجينوم المنصف (The size of the haploid genome).

من هذه المعادلة يمكن تحديد N وهو عدد النسائل التي يجب أن تُختبر لإيجاد التسلسل المعين. وهي كذلك تظهر بأن على الباحث تضبيط متغيرين وهما ما يسمّى باحتمالية إيجاد الجين (بالتأكيد ليس 100٪)، وكذلك حجم القطع. فمثلاً نفترض وجود فطر ذو جينوم منصف = 9×10^7 قاعدة. وبعد الهضم الجزئي قد عزلنا قطع بحجوم 5000 قاعدة. فإذا كنا نريد فرصة 95٪ لإيجاد التسلسل (على افتراض بأن التسلسل المطلوب أصغر من 5000 قاعدة)، وعليه يكون الحساب كالآتي:

$$N = \ln(1 - 0.95) / \ln(1 - (5000 / 9 \times 10^7)).$$

وفي هذا N = 53,922 نسيلة. وهذا العدد يمثل عدد النسائل (المستعمرات) التي يجب أن تختبر لإيجاد تسلسل مستهدف سليم. إن تغيير هذه المعايير يؤدي إلى تغيير عملية المسح. وعلى سبيل المثال فإن زيادة الاحتمالية لكي تكون ناجحة بنسبة 99٪ يزيد من عدد النسائل إلى 82,890. كما أن زيادة حجم القطعة من 5000 إلى 20,000 قاعدة وباحتمالية 95٪ يؤدي إلى خفض عدد النسائل إلى 13,479 (جدول 6 – 2).

جدول (6 – 2). يمثل جينومات كائنات معينة والمستلزمات المسحية لقطع بحجم 10 kb باحتمالية نجاح 95٪

النسائل الممسوحة Colonies screened (N)	حجم الجينوم Genome size (g)	الكائنات الحية
1	$10^3 \times 3.1$	فيروس M 13 phage
1840	$10^6 \times 4.0$	بكتريا *E. coli*
6200	$10^7 \times 1.35$	خميرة الخبز Saccharomyces cerevisiae
82,200	$10^8 \times 1.8$	ذبابة الفاكهة Drosophila melanogaster
735,998	$10^9 \times 1.6$	نبات التبغ Tobacco
1,288,008	$10^9 \times 2.8$	الإنسان Human
6,900,688	$10^{10} \times 1.5$	نبات الذرة *Zea mays* (corn)

تحضير قطع الـDNA:

إن الحصول على الـDNA وتوفيره بكمية كافية يُعدّ الخطوة الهامة في صناعة المكتبة الجينومية، ولنفترض أننا سنستعمل أحد نواقل لامدا، مثل الناقل EMBL4، فإن هذا الناقل هو من النواقل الإحلالية (الاستبدالية Replacement) سعته القصوى حوالي 22 كيلو قاعدة. ومن الصعب أن نحدد حجماً محدداً من التركيبات باستعمال هذا الناقل، بل سيُنتج لدينا في تجربة الاستنسال أحجاماً مختلفة تتراوح من 17 إلى 23 كيلو قاعدة، ولهذا يُفضّل عدم صناعة قطع أصغر لتفادي حدوث الأخطاء. لهذا يُراعى عند تحضير أجزاء

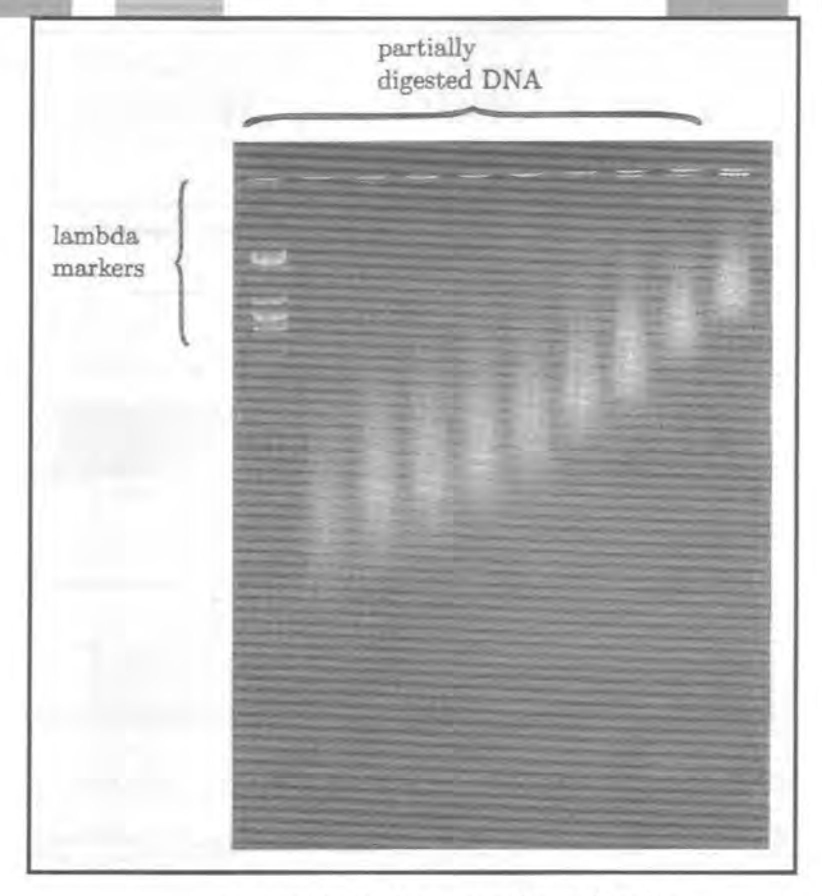
الـDNA المستهدفة بالاستنسال كل من الوزن الجزيئي وطريقة تقطيع وتجزئة الـDNA المُحضّر للتجربة، ونحرص دائماً على استخلاص كمية من الـDNA لا تقل عن 100 كيلو قاعدة للتغلّب على الصعوبات التقنية التي قد نواجهها، وأن نتعامل بلطف حتى لا تنكسر جزيئات الـDNA أثناء عمليات السحب والمزج التي تتعرّض لها.

بعد استخلاص الـDNA يُقطّع ميكانيكياً إما بتمريره خلال إبرة الحقن أو عن طريق الموجات الصوتية (Sonication) التي تُنتج جزيئات مستوية الأطراف تحتاج إلى معالجة لتشكيل الأطراف بإضافة توصيلة أو معشّق (Adapter) أو سلسلة من القواعد المتجانسة التي تكوّن نهايات بارزة مما يساعد على الالتصاق بالناقل.

وقد يستعمل الهضم الإنزيمي للمكتبة الجينومية وينتج عنها تسلسلات مختلفة عن بعضها تماماً، لأن عملية القطع الإنزيمي تحدث فقط في مواقع التميز. ولهذا تستعمل هذه الطريقة مع التعديل مع مراعاة العيوب الآتية:

1. يتكرر موقع القاطع السداسي مثل الإنزيم *Eco*RI مرة بعد كل حوالي 4096 زوج قاعدة (bp) وينتج عن ذلك قطع صغيرة بالنسبة لنواقل لامدا الإحلالية.

2. أي انحراف في التسلسل قد يؤدي إلى انحراف توزيع مواقع تعرف الإنزيمات وتتكوّن مناطق في الجينوم إما أن تحتوي على مواقع إنزيمية قليلة أو فائض منها. وهذا يعني أن الهضم الكامل سيكون غير ملائم لتوليد المكتبة المطلوبة، ولكنه إذا تم الهضم الجزئي باستعمال إنزيم قطع رباعي مثل *Sau*3A والذي يقطع حلزون الـDNA مرة واحدة كل 256 bp فإن ذلك سيُنتج مجموعة من القطع العشوائية بحيث يمكن إتمام ذلك عن طريق تغيّر تركيز الإنزيم أو وقت الهضم، وأن اختبار الترحيل الكهربائي سيُنتج حصيلة هضم تحتوي على أشكال مختلفة الحجم والتوزيع (شكل 6 – 3).



شكل (6 – 3). الهضم الجزيئي للـDNA

إكثار المكتبات الجينومية:

لنفترض أننا هيأنا الظروف المناسبة للهضم الجزئي لعينة الـDNA فينبغي تجهيز العينة بعد ذلك بتفتيتها أولاً بالطرد المركزي (التدرج الكثافي)، ثمّ تفرّدها بالترحيل الكهربائي، ويتم اختيار القطع المناسبة التي تتراوح من 17 إلى 23 كيلو قاعدة (kb).

فإذا استعمل الإنزيم *Sau*3A أو الإنزيم *Mbo*I الذي له تسلسل القطع نفسه، يمكن بعد ذلك إقحام الأجزاء في موقع *Bam* HI في الناقل λEMBL4 (أنظر الشكلين 6 – 4 و 6 – 5). والجزء المُقحم قد يعامل بإنزيم الـPhosphatase لتقليل احتمالية الالتصاق الذاتي أو تكوين المتسلسلات المتكررة (Concatmer).

(a)		*Bam*HI 5'-G↓GATC C-3' 3'-C CTAG↑G-5'	*Sau*3A 5'-N↓GATC N-3' 3'-N CTAG↑N-5'
(b)	*Bam*HI	G CCTAG	GATCC G
(c)	*Sau*3A *Sau*3A	GATC CTAG	GATC CTAG
(d)	يتّحد	GGATC CCTAG	GATCC CTAGG
	ناقل	مُقحم	ناقل

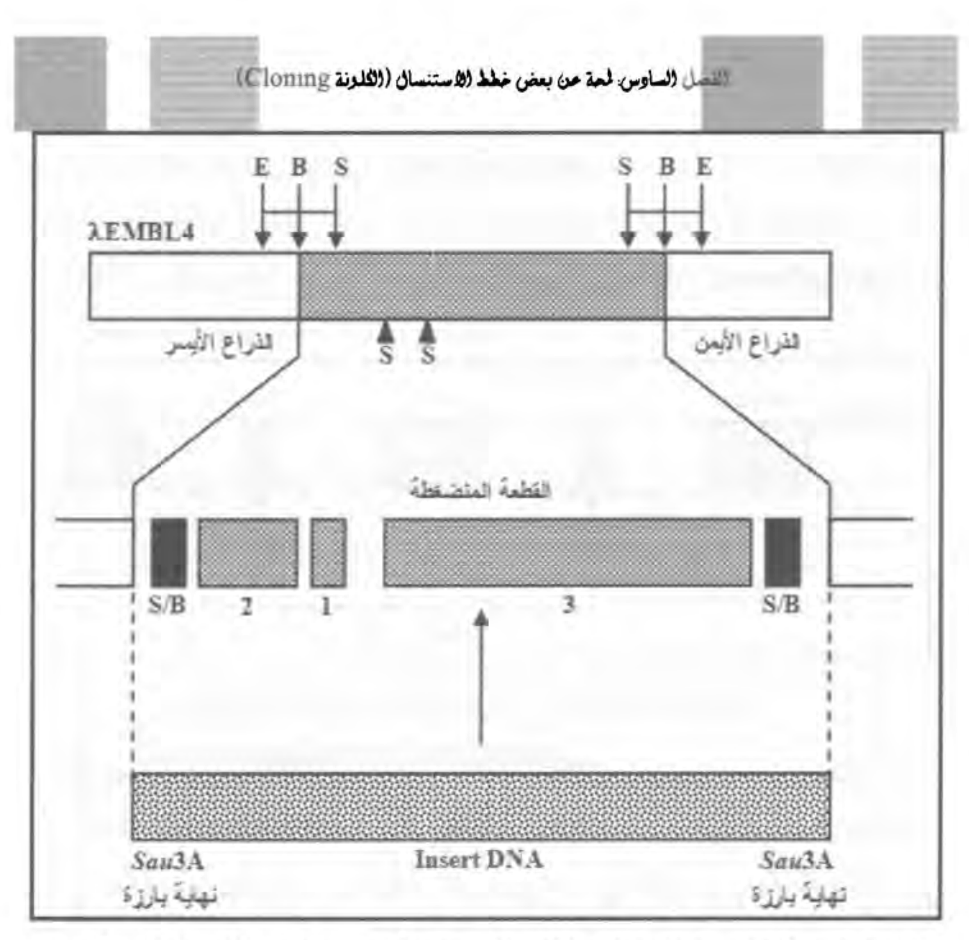
شكل (6 – 4). استنسال قطع *Sau* 3A في مواقع الإنزيم *Bam* HI

(a) مواقع القطع للإنزيمين *Bam*HI و *Sau*3A. في موقع الإنزيم *Sau*3A، N يمثل أيّة قاعدة.

(b) DNA الناقل مقطوع بالإنزيم *Bam*HI لينتج عنه أطراف 5' بارزة مع تتابع القواعد 5'– GATC – 3'.

(c) جزء DNA المُقحم بالإنزيم *Sau*3A وينتج أيضاً أربع قواعد بارزة متمّمة.

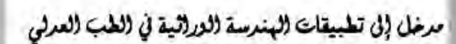
(d) يمكن أن يتّحد DNA المقطوع بالإنزيم *Sau*3A مع النهايات البارزة اللاصقة المتكوّنة بالإنزيم *Bam*HI لتُنتج جزيء rDNA.



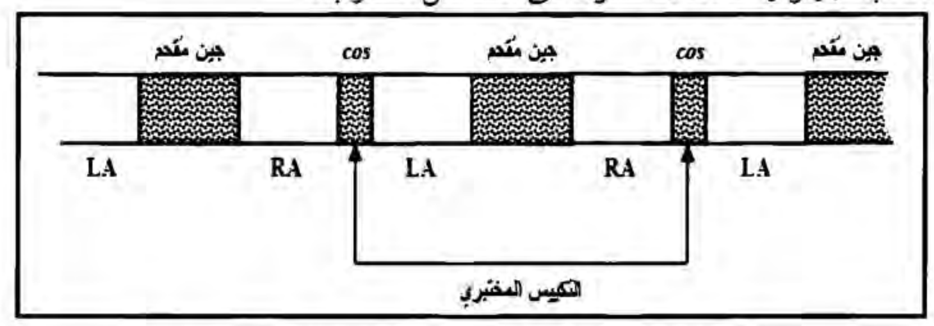
شكل (6 – 5). لصق قطعة الـDNA المقطوعة بالإنزيم *Sau* 3A في الناقل لامدا λ الاستبدالي EMBL4

المواقع على الناقل (E) *Eco*RI. (B) *Bam*HI. (S) *Sal*I. يقطع الناقل بالإنزيم *Bam*HI و *Sal*I اللذان ينتجان خمس قطع من القطعة المنضغطة المظللة في القطعة العلوية. إزالة القطع الصغيرة *Bam*HI / *Sau*3Aالمُشار إليها بالصناديق السوداء (S/B) يمنع القطعة المنضغطة من أن تتحد مرة أخرى، فضلاً عن ذلك فإن الموقعين الداخليين للإنزيم *Sal*I يشقّان القطعة المنضغطة ليتكوّن ثلاث قطع *Sal*I / *Sal*I (1 – 3). ويمكن إزالة القطع الصغيرة من المستحضر بالترسيب بمادة Isopropanol الذي يترك القطع الصغيرة على وجه المحلول. بإزالة القطعة المنضغطة يمكن أن توصل قطعة DNA المهضومة بالإنزيم *Sau*3A في الموقع *Bam*HI للناقل (أنظر الشكل 6 – 4).

ويمكن هضم الناقل بالإنزيمين *Bam*HI و *Sal*I لإنشاء النهايات الالتصاقية البارزة الصالحة للاستنسال، ولفصل القطعة المنضغطة ومنعها من إعادة الالتصاق



الذاتي. وعند إتمام عملية اللصق ينتج عن ذلك متسلسلات متكررة في DNA المركّب، التي تُعدّ المادة الحاثّة لعملية التكييس المختبرية (Packaging *in vitro*) كما هو مُبيّن في الشكل (6 – 6)، وهذا ما يُعرف بالمكتبة الأولية (Primary library)، وهو أهم المكاتب الجينومية المُعدّة للحصول على التسلسل المطلوب.



شكل (6 – 6). الـDNA التركيبي (rDNA) المتسلسل

في حالة لصق أجزاء الـDNA في ناقل مثل λEMBL4 تتكوّن به متسلسلات متكررة لها الذراع الأيسر للناقل (LA)، الـDNA المقحم، الذراع الأيمن (RA) وتتكرر مكونات هذه الوحدة عدّة مرات وترتبط ببعضها في الموقع *cos* بالنهايات البارزة على ذراعي الناقل، ويتم شق الجينوم التركيبي عند الموقع *cos* ومن ثمّ يتكيّس في رؤوس الفاجات.

نحتاج أحياناً إلى تمشيط وكشف المكتبة الجينومية بالكامل للحصول على الجينات المختلفة، وقد نضطر إلى إرسال عينات منها إلى عدّة مختبرات أخرى لتسريع إنجاز المهمة، ولذلك يتحتّم ضرورة إكثار المكتبة بزرع الفاجات الناقلة للـDNAعلى سلالة مناسبة من عوائل البكتريا *E. coli* وعمل مُعلّق من البكتريا ويحفظ تحت ظروف مناسبة لتوزيعه على الباحثين والمختبرات بشكل سليم.

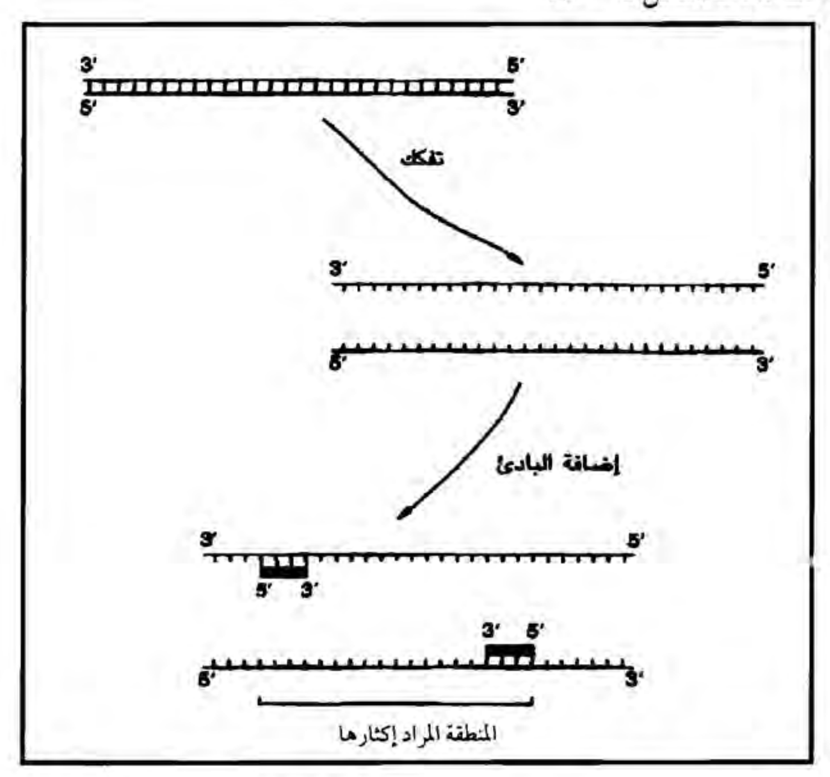
تفاعل إنزيم البلمرة المتسلسل PCR (Polymerase chain reaction)

لقد أدّى تطوير تقنيات استنسال الجين سنة 1970 إلى إنعاش البحث العلمي وتقدّم دراسة الجين، ثمّ تلى ذلك خطوة أخرى مشابهة في منتصف ثمانينيات القرن الماضي، أحدثت ثورة حقيقية في علم البيولوجيا تمثّلت في اختراع ما عُرف بسلسلة تفاعلات إنزيم البلمرة PCR (Polymerase chain reaction) من قبل Kary Mullis

الذي حصل على جائزة نوبل في الكيمياء عام 1993 لهذا الاختراع، والذي تميّز بسهولة تطبيقه ونجاحه في استنسال جزيء الـDNA أو جين معيّن بمساعدة إنزيم البلمرة DNA polymerase، وقد اتّسعت تطبيقات هذا الإجراء في الأبحاث الوراثية وأفرع العلوم البيولوجية الآخرى.

نظرة عامة:

يُستعمل إجراء البلمرة (PCR) لتكبير قطعة معينة من الـDNA اعتماداً على معرفة السلاسل النيوكليوتيدية لأطراف القطعة المستهدفة بالاستنسال لصناعة قطعتين صغيرتين تسمّى كل منها بادئ (Primer) تلتحمان بطرفي السلاسل النيوكليوتيدية، ثمّ تبدأ بصناعة السلسلة المُكمّلة للـDNA (شكل 6 – 7).

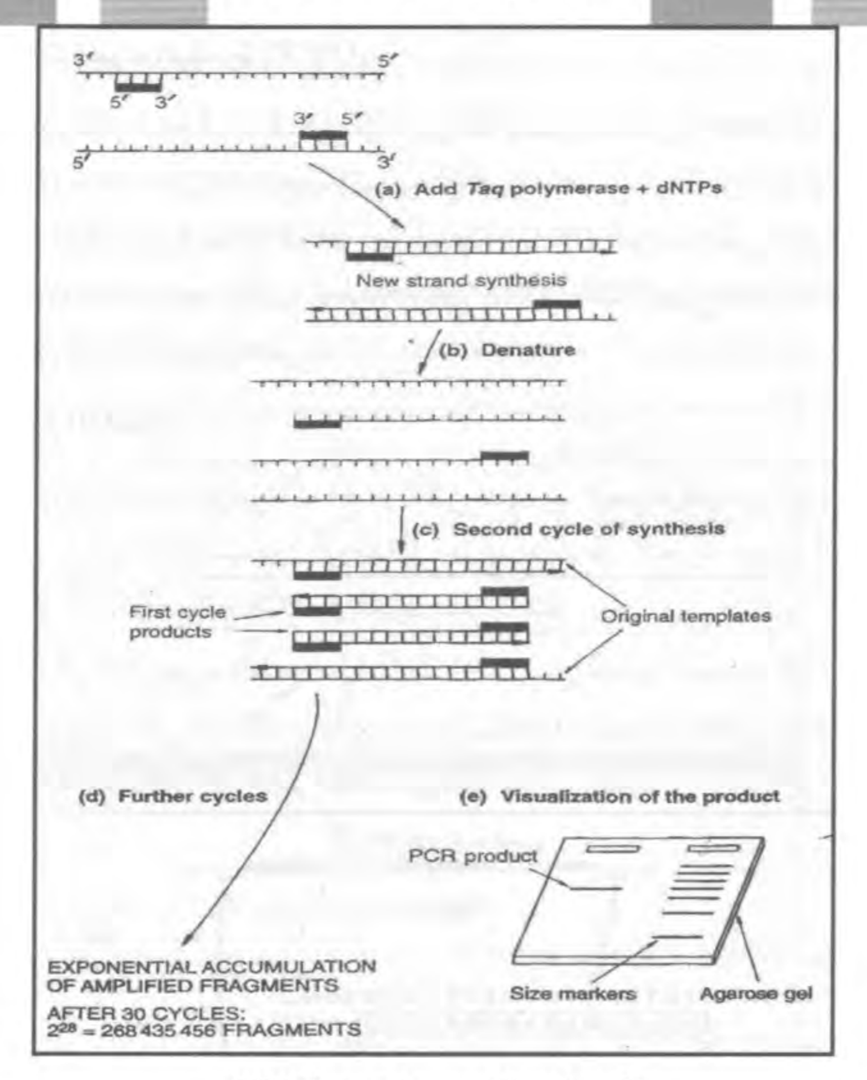


شكل (6 – 7). التهجين الجزيئي للبادئين مع قالب الـDNA في بداية عملية البلمرة (PCR)

ويتم التكبير عادةً باستعمال إنزيم البلمرة DNA polymerase المُستخرج من البكتريا ***Thermus aquaticus*** وهي البكتريا نفسها التي تُنتج الإنزيم ***Taq*I** التي تعيش في الفوارات الساخنة وتحتوي على إنزيم البلمرة ***Taq* polymerase** الذي يقاوم التأثيرات الحرارية العالية.

ولبدء عملية البلمرة أو سلسلة تفاعلات إنزيم البلمرة (PCR) يُضاف الإنزيم إلى القالب البادئ من الـDNA ثمّ يُحضن المزيج حتى تتكوّن الجدائل التكاملية الجديدة (شكل 6 – 8 – a)، ثمّ يُسخّن المخلوط إلى درجة 94 درجة مئوية لكي تنفصل الجدائل المُصنّعة حديثاً من القالب Template (شكل 6 – 8 – b)، ثمّ تبرّد بحيث تتمكّن بادئات أخرى من التهجين في المواقع الخاصة بها، بما في ذلك الأماكن الواقعة على السلاسل المُصنّعة. وتبدأ دورة صناعة الـDNA مرة أخرى (شكل 6 – 8 – c)، وتتكرّر عملية التفكيك والتهجين من 25 إلى 30 مرة مُنتجة في النهاية مئات الملايين من قطع الـDNA المُكبّرة (شكل 6 – 8 – d).

تُفحص نتيجة التفاعل عن طريق الترحيل الكهربائي، وتظهر القطع على هيأة حُزم منفصلة مصبوغة بصبغة بروميد الإثيديوم (Ethidium bromide) (شكل 6 – 8 – e). ولهذا يقدّم إجراء البلمرة (PCR) معلومات كثيرة عن جزيء الـDNA المُكبّر. ويمكن وضع النواتج في البلازميد أو الفاج البكتيري ويُستنسخ ثمّ تُقرأ قواعده بالطرق المُعتادة.



شكل (6 – 8). مراحل تقنية الـPCR.

(a) إضافة إنزيم ***Taq* polymerase** والنيوكليوتيدات الأربع.

(b) المسخ (فتح الأشرطة).

(c) الدور الثانية من التصنيع.

(d) دورات إضافية.

(e) إظهار المنتج بالترحيل الكهربائي.



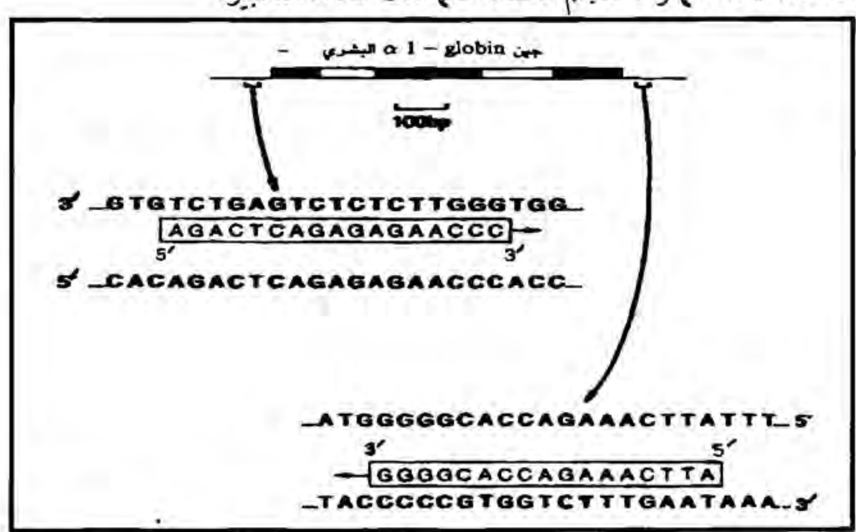
خطوات إجراء البلمرة (PCR):

يتوقّف نجاح تجربة البلمرة على مدى دقّة تصميم البادئين (Primers)، وكذلك ضبط درجات حرارة التسخين والتبريد في دورة التفاعل. والبادئ هو عبارة عن سلسلة نيوكليوتيدية قصيرة تتكامل مع سلسلة الـDNA المفردة، ويكون معها جديلة ثنائية بمساعدة إنزيم البلمرة DNA polymerase، ولهذا يُصنع لكل سلسلة من سلسلتي الـDNA بادئ خاص بها.

تصميم البادئين:

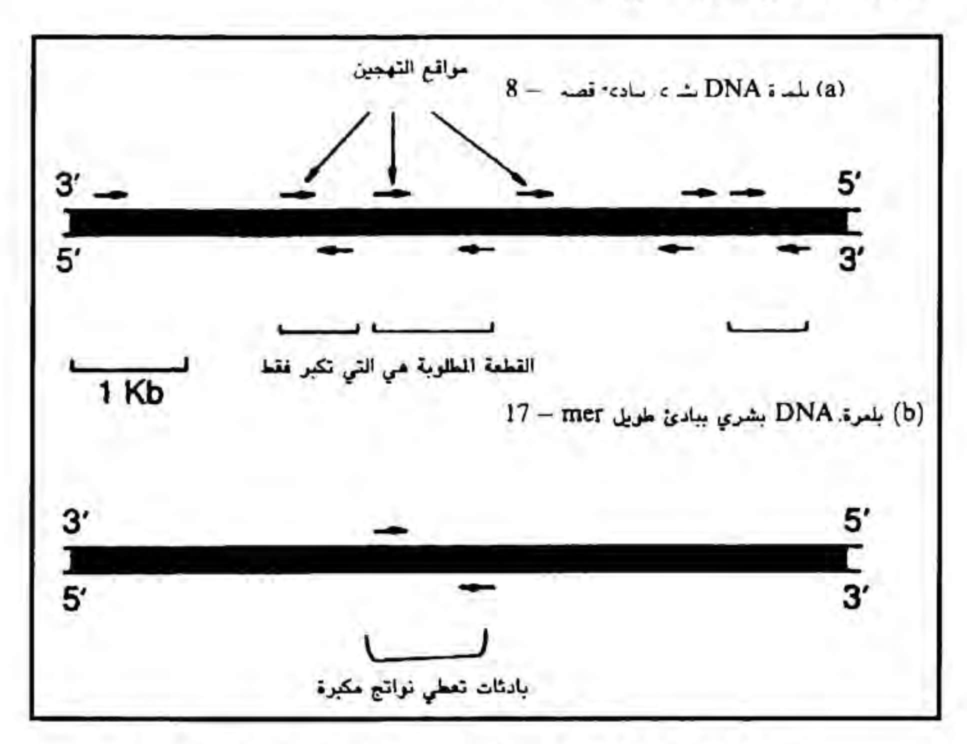
يمثّل البادئان عوامل النجاح أو الفشل لتجارب البلمرة، فالبادئ المُصمّم بدقّة يتكامل مع متوالية القالب دون أي مشاكل، ما عدا ذلك فإن التجربة حتماً إما أن تفشل تماماً، أي لا تتكوّن نواتج PCR، أو تتكوّن قطع خاطئة.

وكل بادئ يجب بالطبع أن يكون مُكمّلاً (وليس مشابهة) لسلسلة القالب لكي يتهجّن معها (شكل 6 – 9)، ويُفضّل أن تكون القطعة المستهدفة بالتكبير لا تتجاوز 3 كيلو قاعدة، لأنه كلما زاد حجم القطعة كلما قلّت كفاءة التكبير.



شكل (6 – 9). بادئين مصممين لتكبير جين α1-globin أكسونات الجين مُبيّنة على هيأة صناديق مقفلة، والأنترونات على هيأة صناديق مفتوحة

ويجب أيضاً ضبط طول البادئ، فإذا كان قصيراً فقد يتهجّن أو يلتحم مع مواقع غير مرغوبة، فلنتخيّل أننا نتعامل مع الـDNA البشري، ولدينا بادئين طول كل منهما 8 قواعد (8-mer) فستكون النتيجة مجموعة كبيرة من القطع، (شكل 6 – 10 – a) نتيجةً لحدوث مواقع التحام مختلفة بمعدل واحد لكل $4^8 = 65536$ زوج قاعدة، ويتكوّن تقريباً 46000 موقع في 3000000 كيلو قاعدة، وهي التي تمثّل الجينوم البشري. أما لو استعمل بادئ يتكوّن من 17 نيوكليوتيدة، نتوقّع حدوث التحام كل $17179869184 = 4^{17}$ زوج قاعدة، وهذا أكبر من طول الجينوم البشري بخمس مرات، ونتوقّع أن البادئ يلتحم مرّة واحدة في الـDNA البشري الكلي، ولا يُعطي البادئ (17-mer) إلاّ قطعة مُكبّرة واحدة ليس أكثر (شكل 6 – 10 – b).



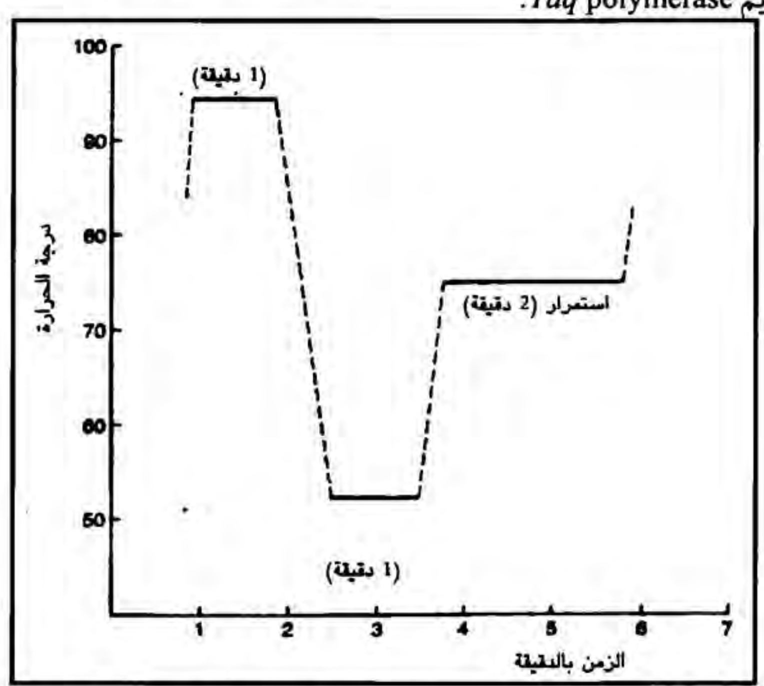
شكل (6 – 10). أطوال البادئات مهمة لإجراء دقيق للـPCR

وتُقاس فاعلية الـDNA بعدد الجزيئات المُكبّرة الناتجة عن التجربة، فهي تقل إذا زاد طول البادئ نتيجة لعدم حدوث الالتحام التام في الوقت المحدّد خلال دورة التفاعل، ولهذا نادراً ما يُستعمل بادئ أطول من 30 نيوكليوتيد (30-mer).

ضبط درجات حرارة الـPCR:

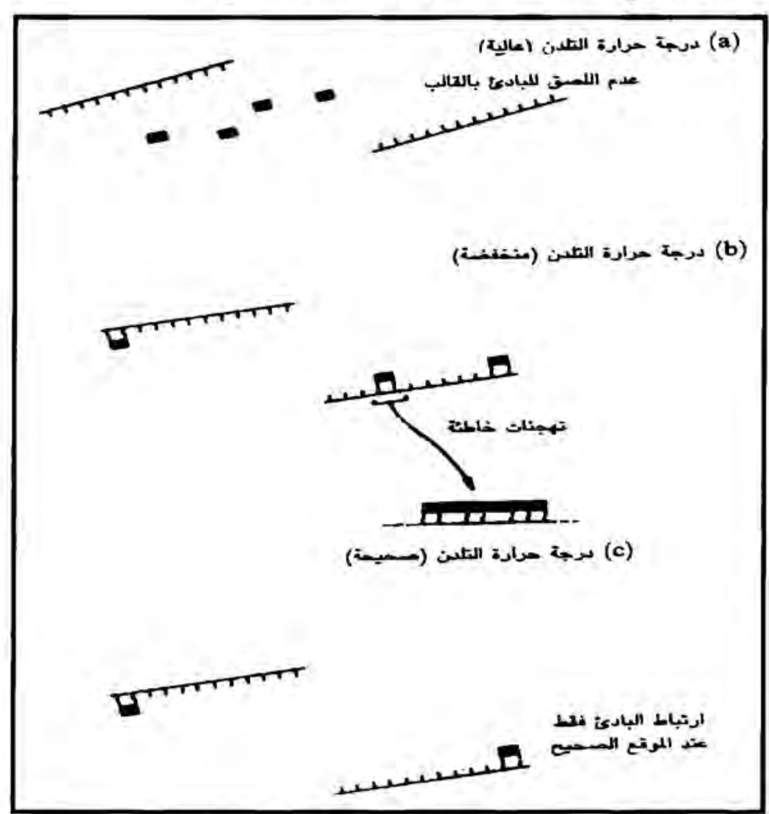
يتعرّض محلول التفاعل أثناء دورة الـPCR إلى ثلاث درجات حرارية مختلفة (شكل 6 – 11) كالآتي:

1. درجة حرارة التفكيك Denaturation وهي حوالي 94°م والتي تعمل على تفكيك القواعد الثنائية للـDNA لتتكوّن سلاسل مفردة تعمل كقوالب في الدورة التالية لصناعة الـDNA.
2. درجة حرارة التهجين أو التلدّن التي تساعد على التحام البادئات مع قوالب الـDNA.
3. درجة حرارة الاستطالة وصناعة الـDNA وهي عادةً 74°م وأقل من الدرجة المُثلى للإنزيم *Taq* polymerase.

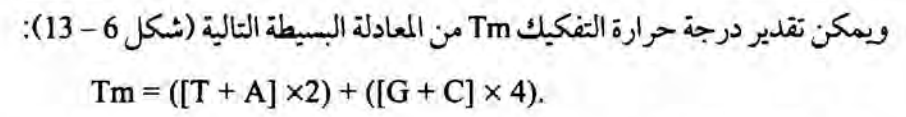


شكل (6 – 11). درجة الحرارة المثالية في إجراء الـPCR

وتعتبر درجة حرارة التلدن Annealing هي المرحلة المهمة، لأنها تؤثر في تهجين جزيئات الـDNA مع البادئ، فإذا كانت درجة الحرارة عالية جداً فلا يحدث أي تهجين بل يبقى كل من البادئ والقالب بمعزل عن بعضهما (شكل 6 – 12 – a). أما إذا كانت درجة الحرارة منخفضة جداً فلن تتوافق التهجينات، أي لا تتوافق عملية التزاوج القاعدي (شكل 6 – 12 – b)، ويعني ذلك أن حساب طول البادئ غير صحيح. أما إذا تمت عملية التحام عشوائي فإن مواقع التهجين لكل بادئ عشوائي يتزايد بشكل كبير، وتتكوّن مواقع غير صحيحة، ولهذا يجب أن تكون درجة الحرارة منخفضة بقدر يكفي فقط لعملية الالتحام ومرتفعة بقدر يكفي فقط لمنع التهجينات غير الصحيحة بين البادئ والقالب (شكل c – 12 – 6)، وتُحسب هذه الدرجة عن طريق تقدير درجة ذوبان (Tm) Melting temperature وهي درجة الحرارة التي تتفكّك عندها القواعد الثنائية بالكامل.



شكل (6 – 12). درجة الحرارة لها تأثير مهم على عملية تهجين البادئ مع قالب الـDNA



ويمكن تقدير درجة حرارة التفكيك Tm من المعادلة البسيطة التالية (شكل 6 – 13):

$$Tm = ([T + A] \times 2) + ([G + C] \times 4).$$

حيث [G + C] تمثل مجموع قواعد السايتوسين والجوانين، و [T + A] تمثل مجموع قواعد الثايمين والأدنين في سلسلة البادئ.

ولهذا تُحسب درجة حرارة التلدّن بحساب درجة الانصهار Tm لكل بادئ، وتستعمل درجة أو درجتان أقل من القيمة الناتجة لتأكيد عملية التهجين الصحيحة، وهذا يعني ضرورة دقة تصميم البادئ بحساب درجة الانصهار بشكل صحيح، وأن تكون واحدة لكلا البادئين.

البادئ: 5'A G A C T C A G A G A G A A C C C 3'

4Gs 5Cs 7As 1T

Tm = (4×9) + (2×8)

= 36 + 16

= 52°C

شكل (6 – 13). حساب درجة حرارة الانصهار Tm للبادئ

دراسة نواتج البلمرة (PCR):

يُمثّل إجراء البلمرة نقطة البداية لمجموعة كبيرة من التجارب والتحاليل التي تهدف إلى الحصول على المعلومات الأكيدة عن جزيء الـDNA، وعلى الرغم من وجود الطرق المتعدّدة لدراسة نواتج البلمرة، إلاّ أن أهمّها ما يأتي:

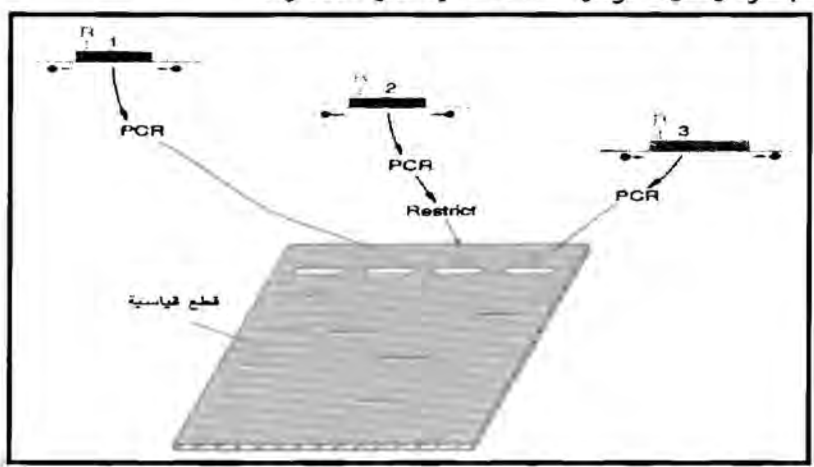
* الترحيل الكهربائي لنواتج البلمرة.
* تحديد تتابع نواتج البلمرة.
* تحليل (استنسال) نواتج البلمرة.

(a) الترحيل الكهربائي لنواتج البلمرة:

تُفحص نواتج البلمرة عن طريق الترحيل الكهربائي لهُلام الأجاروز وفحص حُزم الـDNA المصبوغة بمادة بروميد الإثيديوم في الهُلام المُعرّض للأشعة فوق

البنفسجية. وفي حالة ضعف النواتج فإننا نستعمل تهجين سوذرن. وعند عدم ظهور الحُزمة المتوقّعة أو ظهور حُزم زائدة فإن هذا يعني أن هناك خطأ ما قد حدث ويجب إعادة التجربة. وفي بعض الحالات يستعمل الترحيل الكهربائي ليس فقط للتأكّد من صحة التجربة، وإنما للحصول على معلومات إضافية مثل المواقع الإنزيمية في القطع الناتجة عن التجربة، إذ يُعامل الناتج بإنزيمات القطع الداخلية (Endonucleases) ثم تُفحص بالترحيل الكهربائي.

وعوضاً عن ذلك يمكن استعمال الحجم الصحيح لنواتج البلمرة لإثبات ما إذا كان قالب الـDNA يحتوي على جزء مُقحم أو طفرة إلغاء في الجزء المُبلمر أو المُكبّر (شكل 6 – 14). وفي كلتا الحالتين يستعمل إجراء الـPCR كإجراء يُفضّل عن إجراء الـRFLP، لأنه يمكن أن يُطبّق مع كمية قليلة جداً من الـDNA، وهذا يعكس أهمية إجراء البلمرة وقدرته كوسيلة كشف تقنية عالية الفعّالية.



شكل (6 – 14). الترحيل الكهربائي لنواتج الـPCR يمكن أن تقدّم معلومات عن جزيء قالب DNA

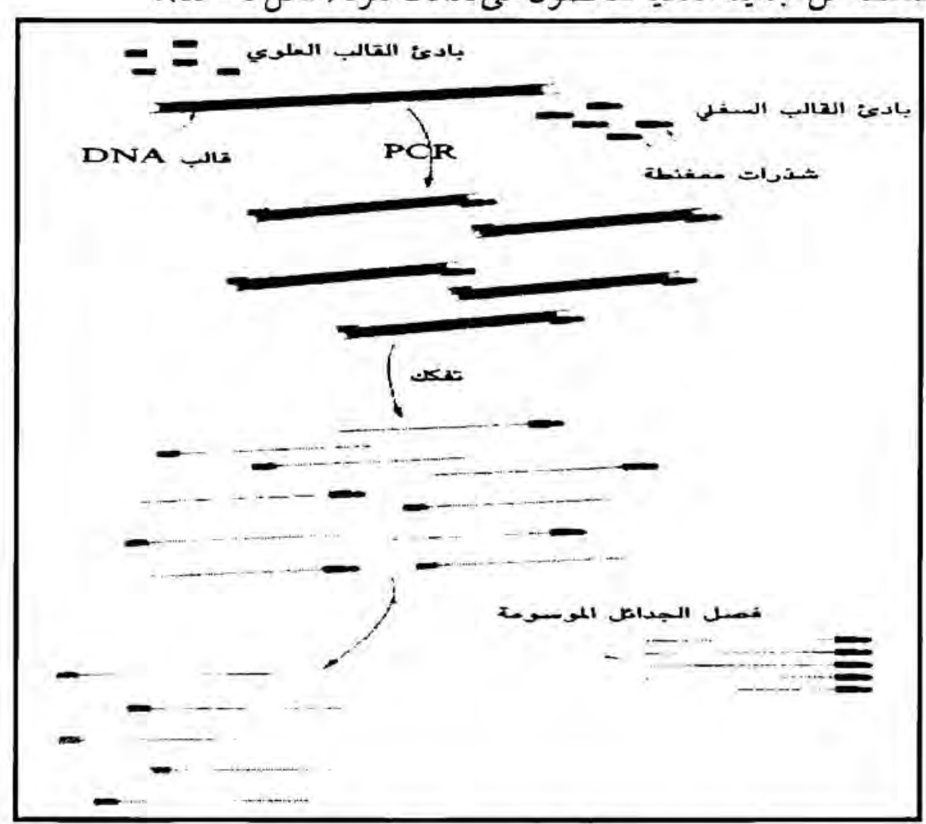
المجال 1 يُبيّن نواتج PCR غير مُعاملة بإنزيم القطع.

المجال 2 يُبيّن نواتج PCR مُعاملة بالإنزيم الذي يقطع الموقع R.

المجال 3 يُبيّن النتيجة المُتحصّل عليها عندما يحتوي DNA القالب على جزء مُضاف في المنطقة المكبّرة.

b) تحديد تتابع نواتج البلمرة:

إذا لم نتحصّل من الترحيل الكهربائي على معلومات كافية فإننا نلجأ إلى إجراء قراءة قطعة الـDNA الناتجة عن عملية البلمرة، وذلك باستنسال الناتج من تجربة الـPCR كما سنرى لاحقاً، ثم سلسلة المتوالية بالطرق المعتادة أو بالطريقة المباشرة المعتمدة على إجراء سانجر وكولسون (Sanger-Coulson). تتكوّن نواتج البلمرة على شكل DNA ثنائي، ولذلك نحتاج إلى سلاسل مفردة حتى تتم القراءة. ولإتمام إجراء البلمرة لدينا عدّة خيارات، أفضلها استعمال بادئين أحدهما عادي والآخر محوّر بطريقة تسهل تنقيته باستعمال شدادات مغناطيسية تلتصق بسلسلة القواعد، وتنفصل الجديلة المُمغنطة عن الجديلة العادية للحصول على DNA مفرد (شكل 6 – 15).



شكل (6 – 15). طريقة لتنقية الـDNA أحادي الجديلة من نواتج الـPCR ثنائي الجديلة

هناك طريقة أخرى مشابهة يستعمل فيها البادئ المُعلّم بالبايوتين، إذ تنفصل الجديلة المفردة بإضافة بروتين الأفيدين الذي يحافظ على انفرادية وانفصال الجديلة.

وعندما نستخلص جديلة الـDNA المفردة تُتم بقية الإجراء، وهو مُشابه لطريقة سانجر وكولسون لسلسلة الـDNA، إذ تصنع سلسلة الجزيئات من السلسلة المُنتهية (Chain terminated) عن طريق أحد إنزيمات البلمرة مثل إنزيم (Sequenase). ويولى الاهتمام بمعرفة سلسلة البادئ المستعمل كنقطة بداية لتفاعلات صناعة الجديلة، ففي إجراء السلسلة يتلدّن أو يرتبط هذا البادئ في موقع محدّد من الناقل الفاجي M13 قُرب الموصل (Polylinker) ويستنسخ فيه الـDNA المُستهدف بالقراءة أو السلسلة. هذا البادئ لا يمكن استعماله مع نواتج البلمرة، لأنها لا تحتوي على متواليات أو سلاسل الناقل الفاجي M13 المناسبة، ولكن عوضاً عن ذلك يمكن الاستعانة بأحد البادئين المستعملين لبدء البلمرة في بدء تفاعلات قراءة المتواليات أو السلسلة، وهذا البادئ يجب أن يتكامل مع الجدائل المفردة المستخلصة.

(c) استنسال نواتج الـPCR:

لمعرفة المزيد عن نواتج البلمرة، تُستنسل القطعة في أحد النواقل، ويتم دراستها بإحدى الطرق المعروفة. وقد يبدو هذا سهلاً من الناحية النظرية، ولكن من الناحية العملية أحياناً نتعرّض لعدد من المشاكل مثل نوعية نهايات القطع الناتجة، فقد تنتهي القطع المبكرة عن طريق إجراء البلمرة بنهايات مصمتة يصعب إقحامها في أحد النواقل بهذا الشكل دون توصيلها بأطراف بارزة بالاستعانة بالوصلة (Linker) أو المعشق (Adapter)، إلاّ أن الأمر ليس بسيطاً أو مباشراً كما قد نتخيّله، فالإنزيم *Taq* polymerase يُضيف نيوكليوتيدة إضافية تكون في الغالب الأدينوسين Adenosine لكل طرفي الجديلة المُصنّعة، وهذا يعني أن نواتج البلمرة ثنائية الجديلة ليست مصمتة الأطراف بل كل طرفيه ′3 بها نيوكليوتيدة مفردة (شكل 6 – 16).

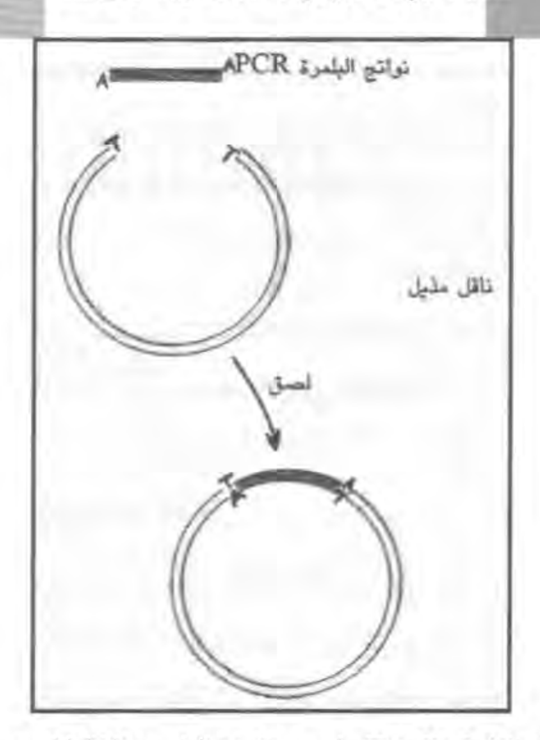
5′		3′
AGACTCAGA	....	AACTTATTT A
|||||||||		|||||||||
A TCTGAGTCT	....	TTGAATAAA
3′		5′

شكل (6 – 16). صناعة السلسلة النيوكليوتيدية (Polynucleotides) عن طريق الإنزيم *Taq* polymerase تحتوي على الأدينوسين Adenosine عند نهاياتها ′3

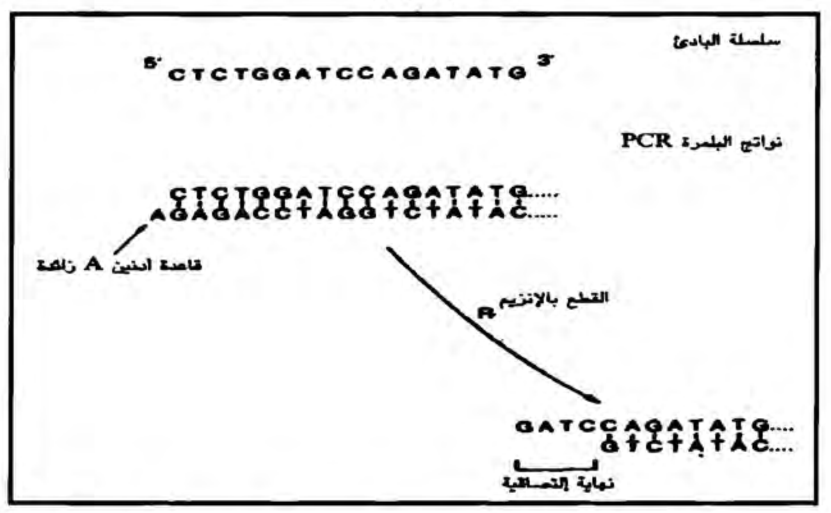
لهذا تتغيّر أطراف الـDNA من أطراف مصمتة إلى أطراف بارزة تحتوي على نيوكليوتيدة واحدة تكوّن جسر طرفي من السهل إزالته بالإنزيم Exonuclease.

إن هذا الإجراء غير مستعمل بشكل كبير نظراً لصعوبة التحكّم في نشاط الإنزيم وصعوبة إيقافه، مما قد ينتج عنه زيادة تحطيم جزيئات الـDNA، وعوضاً عن ذلك يستعمل ناقل الاستنسال الذي توجد به قاعدة الثايمين (T) الإضافية، والذي يلتحم في قطعة الـDNA المكبّرة (شكل 6 – 17). وتُحضّر هذه النواقل عادةً بمعاملة الناقل بالإنزيم وقطعه في موقع النهاية المصمتة، ثمّ معاملته بإنزيم *Taq* polymerase بوجود سلسلة قصيرة من قواعد الثايمين (dTTP) فقط. ونظراً لعدم وجود البادئ فإن الإنزيم Polymerase يقوم بإضافة نيوكليوتيدة الـT إلى الأطراف ′3 من النهايات المصمتة مكوّناً بذلك ناقل مذنّب بقاعدة الثايمين من السهل أن تُقحم به نواتج البلمرة.

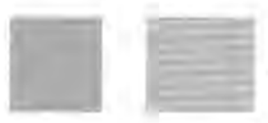
أما الطريقة الثانية وهي المفضّلة، فتشمل صناعة بادئين بهما مواقع إنزيمية محدّدة، وبعد إجراء البلمرة تُعامل القطعة الناتجة بالإنزيم endonuclease الذي يقطع متوالية البادئ مُكوّناً بذلك قطع بارزة يمكن أن تلتحم في ناقل الاستنسال الرئيسي (شكل 6 – 18). ويمكن أيضاً إضافة المواقع الإنزيمية إلى سلسلة البادئ عند كل طرفيه ′5 (شكل 6 – 19)، وهذه القطع لا تلتحم أو تتهجّن مع جديلة القالب، ولكنها تُستنسل خلال إجراء البلمرة، وتتكوّن نواتج DNA تحمل مواقع إنزيمية طرفية.

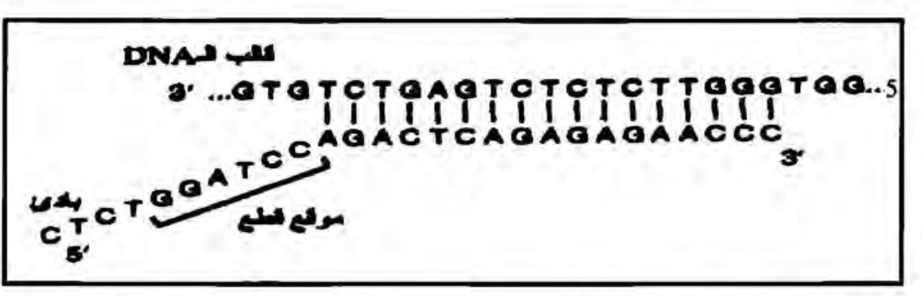


(6 – 7).استعمال ناقل T-talled مذنب بقاعدة الثايمين (T) لاستنسال نواتج البلمرة (PCR)



شكل (6 – 18). الحصول على نواتج PCR مع نهاية التصاقية من خلال استعمال بادئ يحتوي على موقع إنزيمي



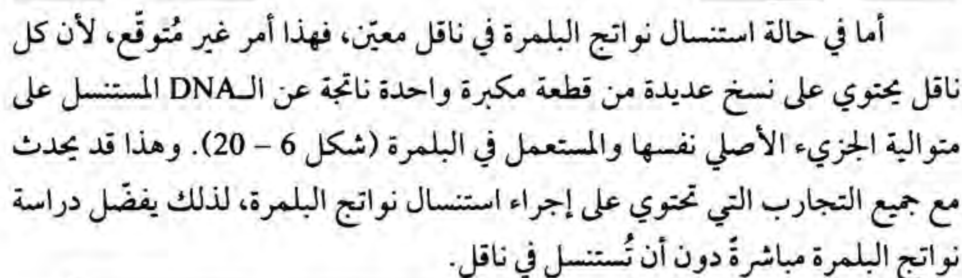


شكل (6 – 19). بادئ PCR له موقع إنزيمي موجود خلال امتداد سلسلة من القواعد في النهاية 5′

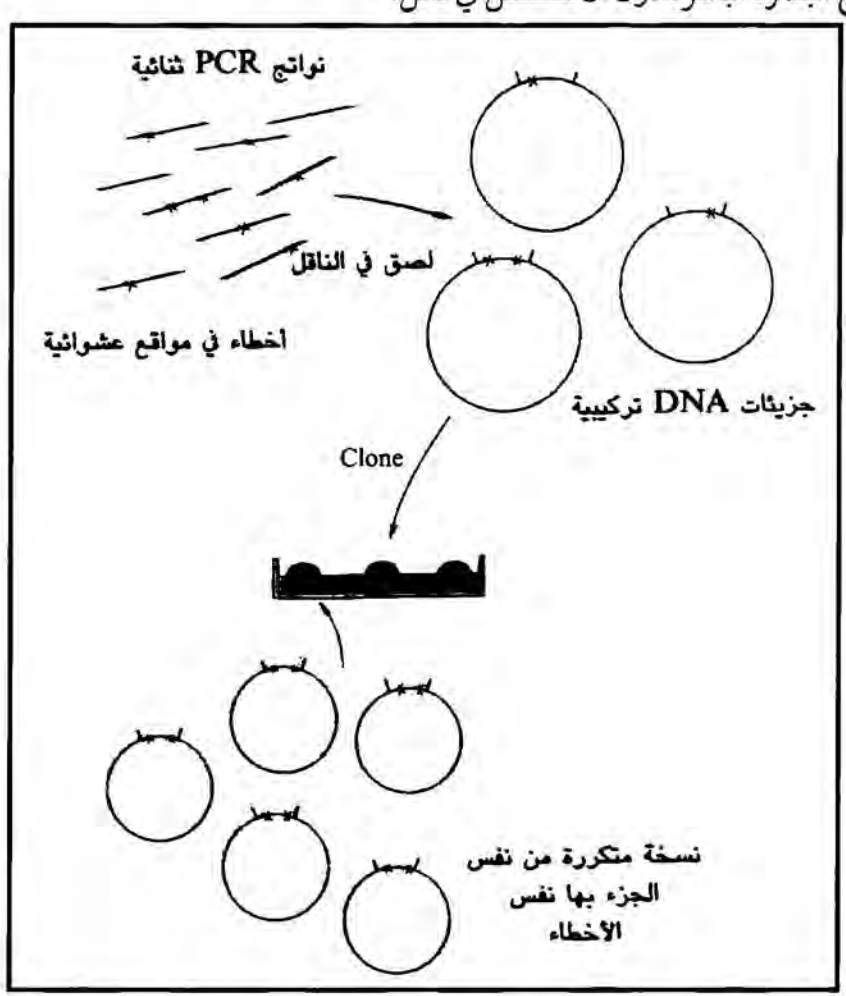
أخطاء الإنزيم *Taq* polymerase:

قد تنشأ عن إنزيمات البلمرة Polymerase مجموعة من الأخطاء تتمثّل بإضافة نيوكليوتيدة خاطئة في سلسلة الـDNA النامية، ولكن معظم هذه الإنزيمات يمكنها إصلاح الخطأ بإضافة السلسلة النيوكليوتيدية الصحيحة بخاصية تُعرف بتصحيح القراءة (Proofreading) التي تعتمد على نشاط الإنزيم Exonuclease من الطرفية 3′ إلى الطرفية 5′ على امتداد السلسلة. أما الإنزيم *Taq* polymerase فهو لا يمتلك هذه الخاصية، أي أنه غير قادر على تعديل الخطأ، وهذا يعنى أن عملية تصنيع الـDNA لا تُعطي دائماً نسخة صحيحة من الـDNA، ويقدّر معدل الخطأ بإحداث غلطة واحدة في كل 9000 نيوكليوتيدة (ويمكن تجاهله)، والذي يترجم في الواقع إلى خطأ في كل 300 زوج قاعدة، لأنه متكوّن عن البلمرة المتكررة في مجموع 30 دورة، أي أن ظهور الخطأ ناتج عن عملية تراكمية، وبذلك تحتوي القطع المتكوّنة عند إتمام عملية البلمرة على نسخ ناتجة عن خطأ قد تمّ حدوثه خلال إحدى دورات عملية التصنيع.

قد لا تُسبب هذه الأخطاء مشاكل كثيرة خاصة في حالة القراءة المباشرة لنواتج البلمرة، فهو غالباً يقدّم التسلسل الصحيح لقالب الـDNA حتى لو احتوت نواتج الـPCR على أخطاء ناتجة عن الإنزيم *Taq* polymerase، لأن الأخطاء موزعة عشوائياً، وكل قطعة مُكبرة لها خطأ في نيوكليوتيدة محدّدة، وتتكوّن العديد من الجزيئات التي تحمل المتوالية الصحيحة مما يُقلّل من أهمية هذا الخطأ.



أما في حالة استنسال نواتج البلمرة في ناقل معيّن، فهذا أمر غير مُتوقّع، لأن كل ناقل يحتوي على نسخ عديدة من قطعة مكبرة واحدة ناتجة عن الـDNA المستنسل على متوالية الجزيء الأصلي نفسها والمستعمل في البلمرة (شكل 6 – 20). وهذا قد يحدث مع جميع التجارب التي تحتوي على إجراء استنسال نواتج البلمرة، لذلك يفضّل دراسة نواتج البلمرة مباشرةً دون أن تُستنسل في ناقل.



شكل (6 – 20). معدل الخطأ العالي لإنزيم *Taq* polymerase يُصبح عاملاً مهماً عندما تُستنسل نواتج الـPCR

تطبيقات تفاعل الـPCR:

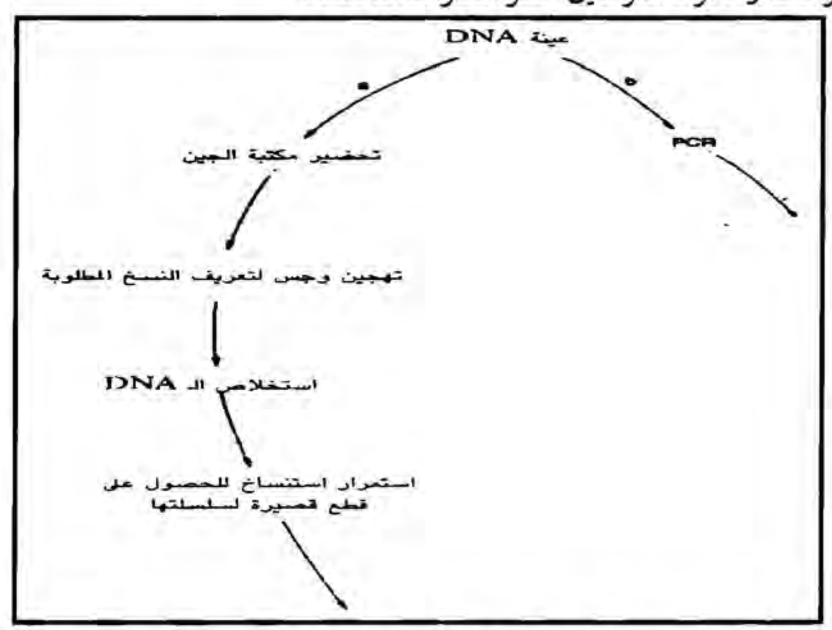
قد يبدو مما سبق أن تفاعل البلمرة هو عبارة عن تكبير قطعة من الـDNA اعتماداً على معرفة السلاسل النيوكليوتيدية لأطراف هذه القطعة، مما سهّل عملية تحليل بعض مناطق الـDNA التي لم تُدرس من قبل بالطرق المعتادة. فإذا كان الأمر كذلك فلماذا أصبح هذا الإجراء من الأمور المهمة في مجالي البيولوجيا الجزيئية والتقنيات الحيوية؟ الإجابة عن هذا السؤال قد نستشفّها من عرض الأسباب التي نتناولها في الفقرات الآتية:

استعمال الـPCR في دراسة كمية قليلة من الـDNA:

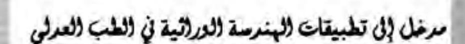
لتقنية الـPCR مقدرة فائقة في إكثار جزء صغير من الـDNA مثل تكبير DNA الحيوان المنوي الذي يحتوي فقط على نسخة مفردة من الجينوم البشري. وقد أدّت هذه الدقّة إلى إمكانية تطبيق التحاليل البيولوجية الجزيئية على عينات قليلة من الـDNA قد لا تكفي لإجراء الاستنسال العادي، كما برهنت أيضاً على أهميتها في مجال الطب الشرعي، وخاصةً فيما يُعرف بالبصمة الوراثية من مصادر بيولوجية صغيرة مثل الشعرة أو بقايا بقعة دم في موقع الجريمة، ممّا ضيّق الخناق أمام المجرمين وصعوبة هروبهم من قبضة القانون والعدالة. وقد استعمل هذا الإجراء في تكبير عينات الـDNA من عظام الأموات والتعرّف على الضحايا، مثلما تمّ في محاولة التعرّف على عظام نيكولاس الثاني Nicholas II آخر قياصرة روسيا والذي دُفن سنة 1917 في مكانٍ ما في مدينة أكترنبرج Ekaterinburg. كما فتحت قدرة وحساسية هذا الإجراء آفاقاً جديدة في علم الآثار والحفريات Palaeontology، إذ أصبح بالإمكان الحصول على سلاسل نيوكليوتيدية قصيرة من DNA بقايا مواد محنّطة أو مُجمّدة، أو دراسة صلة القرابة والعلاقات الوراثية بين المجتمعات البشرية وبين الشعوب القديمة من خلال دراسة بقايا الـDNA الموجودة في مخلّفات عظامهم أو محفوظة منذ زمن بعيد مثل مومياء الفراعنة المحنّطة أو حتى الجثث الغارقة والمُتحلّلة، كما استعمل في حل طلاسم أصول الأمريكيين الأوائل ومسالك المهاجرين الين استعمروا الباسفيك، وفي قياس الزمن الجيولوجي لبقايا النباتات، ودراسة الحشرات المدفونة في صمغ النبات أو في صمغ الكهرمان منذ قرون بعيدة.

الـPCR والتشخيص الطبي:

لقد استعمل إجراء الـRFLP في الكشف عن الطفرات الجينية البشرية التي قد تؤدّي إلى تكوين الأمراض الوراثية اعتماداً على الطفرة أو تغيير موقع الإنزيم على متوالية الـDNA، وما يترتّب على ذلك من تغيّر في طول القطعة التي يقع عليها الإنزيم. لكن هناك الكثير من الطفرات المُمرضة لا ينتج عنها نمط RFLP إلاّ إذا قرأت السلسلة النيوكليوتيدية للمناطق الجينومية، الأمر الذي يتطلّب تحضير المكتبة الجينومية لكل مريض واستخلاص النسخة التي تحتوي على الجين الكامل للطفرة (شكل 6 – 21 – a). وفضلاً عن صعوبة تطبيق هذا الإجراء، فهو أيضاً مستهلك للوقت، لذلك يستعمل إجراء البلمرة بدلاً عنه، لأنه يقدّم معلومات وفيرة وبشكل أسرع بكثير عن المنطقة المُستهدفة من الجينوم وتحليلها مباشرةً (شكل 6 – 21 – b). هذه الخطوة مهمة ليس في سرعة رصد الطفرات والتشخيص الطبي فقط، وإنما في بحوث الأمراض الوراثية التي تعتمد على فحص المجموعات والأفراد المُعرّضين لخطر الطفرات المُحتملة.



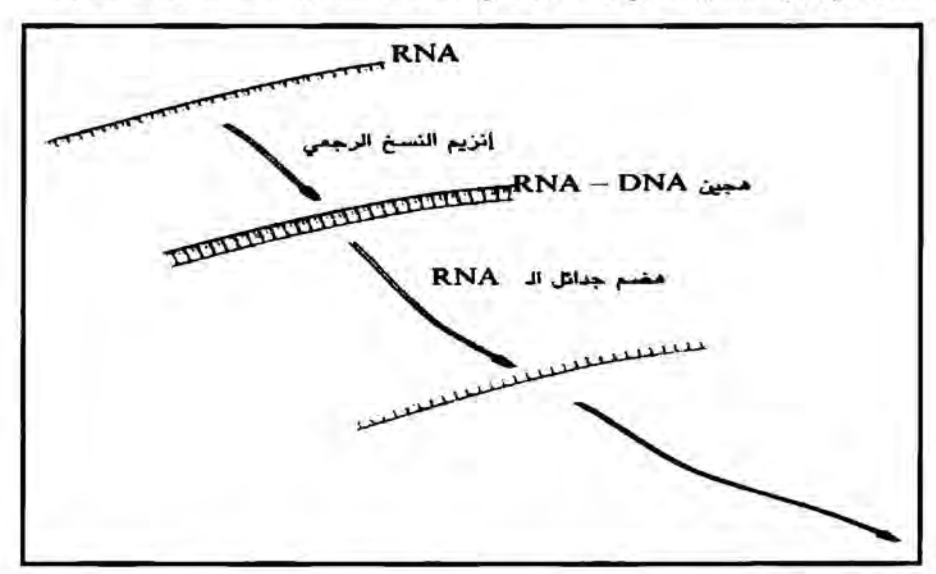
شكل (6 – 21). مقارنة بين (a) الطريقة العادية و (b) طريقة الـPCR في الحصول على متوالية الجين من DNA الإنسان



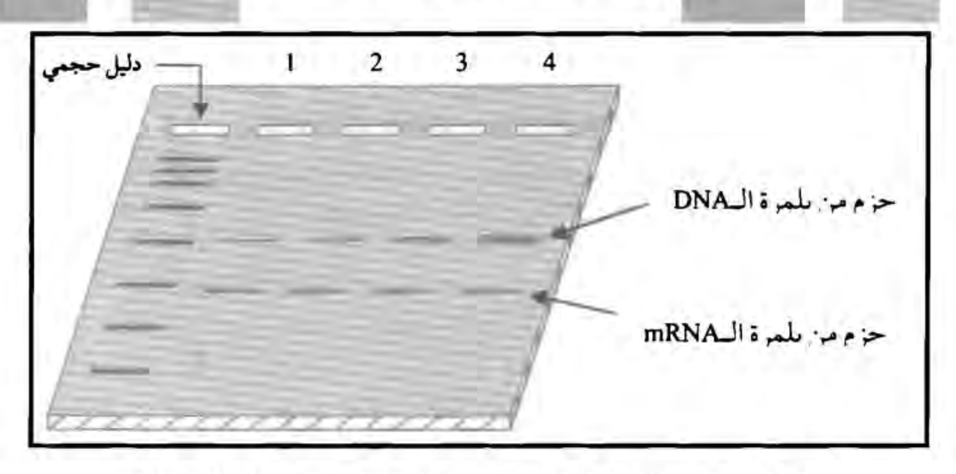
ولقد أمكن عن طريق استعمال الـPCR تشخيص المسببات المرضية قبل أن تظهر أعراضها بأسابيع أو شهور، كما يمكن أيضاً الاعتماد على الخاصية نفسها في العلاج المبكّر للفيروسات المُسببة للأمراض السرطانية مثل سرطان عنق الرحم الناتج عن الفيروس Papillomaviruses.

استعمال الـPCR لتكبير الـRNA:

لا يقتصر إجراء البلمرة على تكبير قوالب الـDNA فقط، بل يمكن أيضاً تكبير جزيئات الـRNA التي تحوّل إلى سلاسل مفردة من الـDNA باستعمال إنزيم النسخ العكسي Reverse transcriptase (شكل 6 – 22). ويتمثّل استعمال إجراء RT-RCR في قياس كميات الـmRNA في الأنسجة المختلفة أو في النسيج نفسه وفي أوقات زمنية متفاوتة (شكل 6 – 23). ونظراً لأن كمية الـmRNA في الخلية تمثّل مقدار نشاط الجين، لهذا يمكن قياس هذا النشاط كمياً عن طريق تهجين نورثرن Northern hybridization لقياس الكميات الكبيرة فقط، ولكن إجراء البلمرة يمكن أيضاً أن يقيس الكميات القليلة وخاصةً للجينات الضعيفة.



شكل (6 – 22). النسخ العكسي للـmRNA وإكثاره بطريقة RT-PCR



شكل (6 – 23). التقدير الكمّي لنواتج البلمرة (RT-PCR)

تم إجراء البلمرة PCR باستعمال عينات تحتوي على كميات متساوية من الـRNA ولكن كميات الـDNA كانت متزايدة وتحتوي على الجين الذي ينسخ منه الـmRNA، والقطعة المستهدفة بالبلمرة تشمل أنترون يقع داخل الجين، ولهذا تكون نواتج البلمرة من الـDNA ناشئة عن الـmRNA، وتظهر الحزم المتكونة عن عينات الـRNA والـDNA في المجال رقم 2 على الهلام بالكثافة نفسها إشارةً إلى أن نواتج البلمرة تحتوي على عدد متساوي تقريباً من نسخ المتوالية المستهدفة بالدراسة في كل من الـDNA والـmRNA.

مقارنة الجينومات المختلفة:

عند استعمال بادئين قصيرين جداً ينتج عنهما مزيج من القطع المختلفة، وهذا أمر غير مرغوب فيه بصورة عامة، ولكن يُفيد في دراسة التواريخ العرقية (Phylogenetics) الذي يكشف عن تاريخ التطوّر (Evolution)، وتحديد نسب الأنواع الحية إلى بعضها متمثّلاً في نمط حزم نواتج البلمرة باستعمال البادئ العشوائي والترحيل الكهربائي الذي يعكس تركيب جزيء الـDNA المستعمل كقالب، فإذا استعمل DNA الخلية الكامل كمادة أولية، فإن نمط الحزم الناتجة يمثل انتظام جينوم الخلية، وبهذا يمكن قياس الاختلافات بين جينومات كائنين سواء من النوع نفسه أو نوعين مختلفين باستعمال بادئين عشوائيين (Random primers) ويتوقع أن ينتج كائنان

لها صلة وطيدة ببعضها نمطاً من الحزم المتشابهة أكثر من الكائنات بعيدة الصلة من حيث المنشأ في مفهوم التطوّر، ويُطلق على هذا الإجراء (Random amplified polymorphic DNA) ويُختصر RAPD. وكما هو الحال في دراسات التواريخ العرقية Phyolygen يُعدّ تفسير نتائج RAPD من الأمور المُعقّدة ولا يوجد حتى الآن اتفاق على الطريقة المُثلى لتحليل النتائج.

وقد تمت محاولات عديدة اعتمدت على هذه الطريقة، مثل دراسة الأجسام الثمرية للفطر أرميلاريا بلبوس *Armillaria bulbose* التي تمّ تجميعها من مساحة جغرافية كبيرة في شمال ولاية مشيگان الأمريكية. وقد أظهرت نتائج الـRAPD أن لها جينومات متشابهة، ولا تُظهر أي اختلافات داخل النوع الواحد، لأن الموقع يحتوي على نسخة واحدة من الفطر، وربما يكون هو أحد أقدم الكائنات الذي حافظ على تركيبته الوراثية على الكرة الأرضية منذ أقدم العصور.

التهجين الجزيئي:

يمثّل تهجين الأحماض النووية أحد الإجراءات الأساسية في تكنولوجيا الجين لإنتاج الـDNA التكميلي (cDNA) أو المكتبة الجينومية الوراثية باستعمال المجس Probe الذي يستكشف المكاتب الجينومية والتعرّف على تسلسلاتها.

مجسات الحامض النووي (Nucleic acid probes):

تعتمد قوة التهجين على التحام التسلسلات التكاملية (Complementary sequences) مع بعضها بناءً على درجة التجانس بين تسلسلات التهجين.

ويُصنع المجس من سلسلة من القواعد تتكامل مع سلسلة آخرى في الجين الموجود في الـDNA المستهدف للدراسة، وقد يستعمل المجس المُعد من أحد الكائنات في الكشف عن نسخ الجين نفسه من كائنات أخرى، لذلك استعملت هذه المجسات في تعريف عدد كبير من الجينات المُشابهة من مصادر مختلفة، وهي على ثلاثة أنواع:

(1) مجس الـDNA المُكمّل (cDNA).

(2) مجس الـDNA الجينومي.

(3) مجس السلسلة النيوكليوتيدية القصيرة (Oligo nucleotide).

تعتمد صناعة المجس على معرفة تسلسل الجين المستهدف، فقد تستعمل نسخة من الـcDNA كمجس لاستكشاف المكتبة الجينومية مباشرةً، وقد يصنع الـcDNA من الـmRNA الذي يستعمل غالباً فيما يُعرف بطريقة الكشف الموجب والسالب plus / minus التي نلجأ إليها عند صعوبة تعبير الجين، لهذا تصنع المجسات من mRNA الخلايا التي تُعبّر عن الجين، وهذا ما يُعرف بالمجس الموجب، أو من الخلايا التي لا تُعبّر في الجين وهذا ما يُعرف بالمجس السالب.

تتكوّن مجسات الـDNA الجينومي من تسلسلات مُستنسلة تستعمل كمجسات غير متشابهة لجس محتويات الجين المُستهدف.

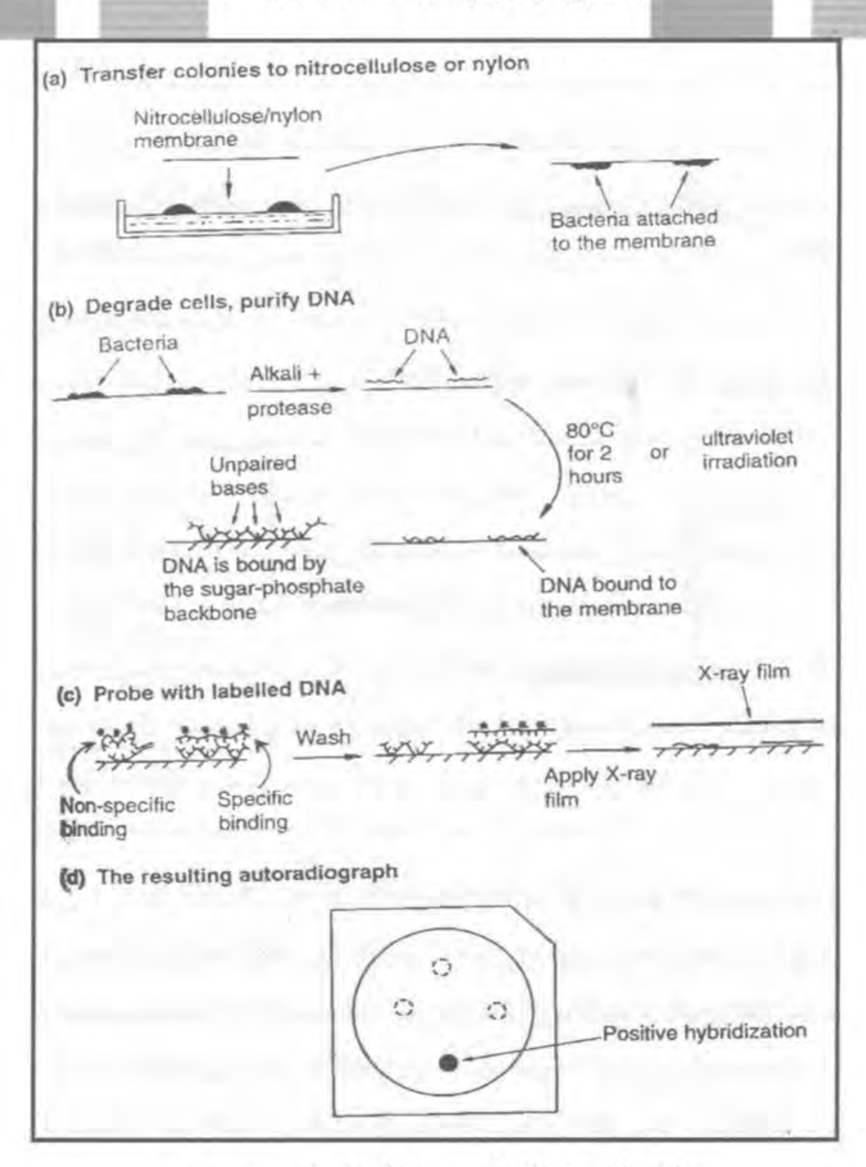
وهذه الإجراءات يُطلق عليها المشي على الكروموسوم (Chromosome walking) أو القفز على الكروموسوم (Chromosome jumping)، وهي إجراءات يمكن عن طريقها تعريف التسلسلات القصيرة المتداخلة التي تُضم فيما بعد إلى بعضها لإنشاء القطع الطويلة من الـDNA وتوصيفها.

تستعمل السلاسل النيوكليوتيدية القصيرة بناءً على توفّر المعلومات المتعلّقة بتسلسل الحامض الأميني للبروتين الذي يُنتجه الجين المُستهدف. ونظراً لأن الطبيعة الإنحلاليّة للشفرة الوراثية تعني عدم توقّع شكل التسلسل المتكوّن عن هذا البروتين، وللتغلّب على ذلك يستعمل مزيج من المجسات التي تطابق جميع التسلسلات المتوقعة، والميزة هنا أن هذه المجسات تحتاج فقط إلى أجزاء صغيرة من التسلسل المطلوب حتى ترتبط به، وفي حال الحصول على المجس المناسب يوسم بالفسفور المُشع P^{32} للكشف عن الجين المُستهدف.

فحص بنوك الاستنسال:

إن الاعتماد على الهالات (مناطق التحلل) الفيروسية أو المستعمرات البكتيرية قد لا يفي في بعض الأحيان كوسيلة للكشف المباشر، لذلك تستعمل طريقة الطبع على أغشية النيتروسيليلوز أو النايلون (أغشية التهجين) أو ما يُسمّى بالتهجين الجزيئي، إذ تُنمّى الخلايا على طبق أجار ثمّ يوضع غشاء التهجين على سطح طبق الأجار لتلتصق المستعمرات النامية على الطبق، وتكون مثل صورة على مرآة، ثمّ تعالج الأغشية لإظهار الـDNA وإزالة مخلّفات الخلايا.

يُضاف المجس المعلّم إلى الغشاء في كيس بلاستك (حقيبة التهجين) يحتوي على دارئ التهجين، ويُحضن عند درجة حرارة مناسبة بحيث توضع حقيبة التهجين في جهاز هزّاز (يهتز بهدوء) لإتاحة ارتباط المجس مع التسلسل المُشابه له في الـDNA. وبعد ذلك يتم إخراج الأغشية وغسلها وتجفيفها، ومن ثمّ تُعرّض لفلم أشعة سينية للحصول على الصورة الإشعاعية الذاتية التي يمكن مقارنتها مع الطبق الأصلي لتعريف المستعمرة المحتوية على الـDNA المُستنسل (Recombinants) (شكل 6 – 24).



شكل (6 – 24). التهجين الجزيئي للمستعمرات

(Colony hybridization)

(a) نقل المستعمرات على غشاء التهجين. (b) تحلل الخلايا وتنقية الـDNA.

(c) إضافة المجس المعلّم. (d) نتيجة الصورة الإشعاعية الذاتية.

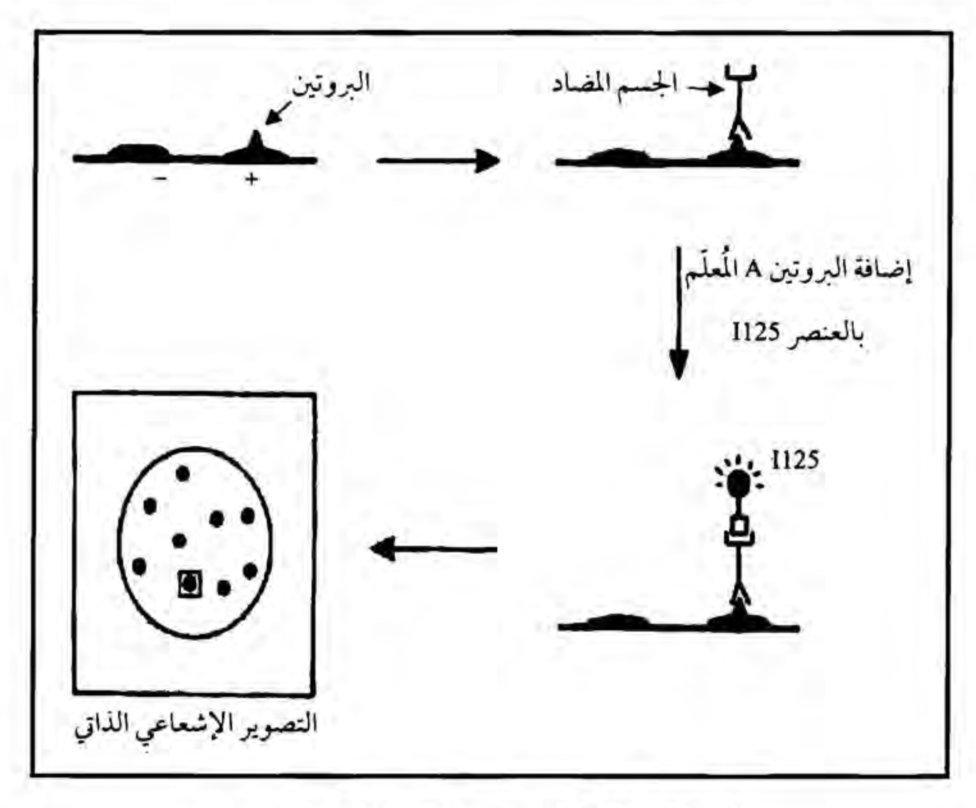
الكشف المناعي:

إن الإجراء البديل عن الكشف بالمجسات للتعرّف على جين معيّن في المستعمرة هو التعرّف على الناتج البروتيني لذلك الجين بالطرق المناعية، وذلك باستعمال جسم مضاد (Antibody) معيّن يرتبط مع ناتج الجين (البروتين) بدلاً من مجس الـDNA.

يوجد نوعان مهمان من تحضيرات الأجسام المضادة، وهي:

1. الأجسام المضادة متعدّدة النسيلة (Polyclonal antibodies)، والتي تحضّر من خلال حقن الأرانب بالمستضد (Antigen) ثمّ سحب عينة من الدم بعد حدوث الاستجابة المناعية بحيث تُنقّى جزيئات بروتين الجلوبيولين المناعي (Immunoglobulin) من المصل ثمّ يستعمل كمستحضر أجسام مضادة، وهي التي يُطلق عليها المصل المضاد (Antiserum) التي تتميّز بالمراكز المستضدية.
2. الأجسام المضادة أحادية النسيلة (Monoclonal antibodies)، وهي أكثر تخصصاً، إذ تتميّز بمراكز مستضدية مفردة. ونظراً لأن إنتاج هذه الأجسام المضادة يحتاج إلى تقنية معقّدة، لهذا تستعمل طرق أخرى مشابهة لطريقة نقل الهالات مع وجود مجسات الـDNA.

لدينا في المثال أدناه (شكل 6 – 25) خلايا متحوّلة بالفاج λgt11 وcDNA تعبّر عن الإنزيم β-galactosidase. يتم التقاط البروتين (الإنزيم) على غشاء التهجين، ثم يرتبط به الجسم المضاد، ويكشف عنه باستعمال جزيء التحام ثانوي غير متخصص مثل بروتين A المُستخلص من البكتريا أو جسم مضاد ثانوي يرتبط بالجسم المضاد الأولي المخصص لهذه الغاية. وعادةً ما يتم الاستدلال على نجاح الكشف بالتوسيم الإشعاعي للبروتين باليود المشع I^{125} أو باستعمال طرق غير إشعاعية تنتج مواد ملونة.

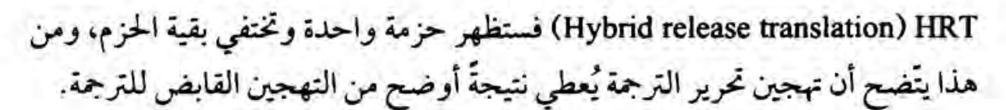


شكل (6 – 25). الفحص المناعي لتعبير الجينات

يؤخذ الغشاء من الطبق الذي يحتوي على التركيبات المتكونة من cDNA والناقل لامدا. يلتصق البروتين وبقايا الخلية مع المرشّح. تظهر هالات البروتين المستهدف (+) الذي يصعب تمييزه عن بقية البروتين (–). يُحضن المرشّح مع الجسم المضاد الأول والمتخصص بالبروتين المستهدف الذي يرتبط مع البروتين A الموسوم بالعنصر المُشع، ثمّ يؤخذ التصوير الإشعاعي الذاتي.

عند استعمال حامض أميني مُشع مثل $[^{35}S]$ methionine في مخلوط الترجمة فسوف يوسم البروتين المُصنّع من الـmRNA ويمكن اكتشافه بالتصوير الإشعاعي أو الفلوري من خلال الترحيل الكهربائي لهُلام متعدد الأكريل أمايد (SDS-polyacrylamide).

وبناءً على ذلك تظهر في الصورة عند استعمال طريقة قبض الترجمة HART (Hybrid arrest translation) كل الحزم ما عدا واحدة. أما في طريقة تحرير الترجمة



HRT (Hybrid release translation) فستظهر حزمة واحدة وتختفي بقية الحزم، ومن هذا يتّضح أن تهجين تحرير الترجمة يُعطي نتيجةً أوضح من التهجين القابض للترجمة.

خرائط التقطيع الإنزيمي:

إن الحصول على الخريطة الإنزيمية لقطعة الـDNA المستهدفة بالدراسة يُعدّ أمراً ضرورياً قبل الدخول في أيّة تجربة، لأن الخريطة الإنزيمية توفّر قطعاً صغيرة من الـDNA يسهل استعمالها في إجراءات عدّة بما في ذلك الاستنسال أو تحضير مجسات المشي على الكروموسوم (Chromosome walking) ودراسة تسلسل الـDNA، إذ يُقطّع الـDNA بعدّة إنزيمات لتحديد عدد القطع الناتجة عن كل إنزيم. ويتم اختيار الإنزيم الذي يقطع الـDNA من 2 – 4 قطع بإجراء سلسلة من الهضم المفرد والمتعدّد، ومن ثمّ يمكن ضم الخريطة الإنزيمية الكاملة إلى بعضها واستنباط المعلومات اللازمة لتوصيف القطعة الكاملة.

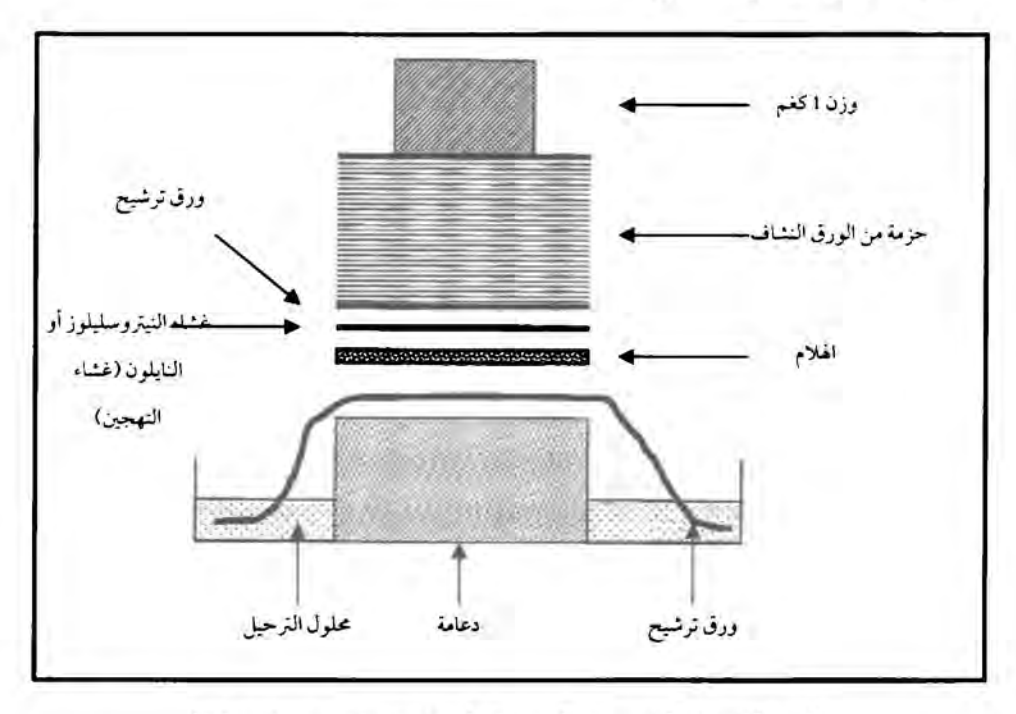
تقنيات وصمة التهجين (Blotting techniques):

قد لا تكفي الخريطة الإنزيمية وحدها للإحاطة بالمعلومات المطلوبة عن القطعة المُستنسلة ومعرفة الجينات التي تحتويها، إذ إن هدفنا في النهاية هو الحصول على تسلسل الجين وما يتعلّق به من معلومات، فمثلاً لا نستطيع أن نبدأ مباشرةً بدراسة التسلسل لقطعة طولها 20 كيلو قاعدة من الـDNA في الناقل لامدا الاستبدالي لنتعرّف على تسلسل صغير لجين طوله 2 كيلو قاعدة فقط يقع داخل هذه القطعة، لأن ذلك يُعدّ مضيعةً للوقت والجهد، لذا ابتكرت طريقة وصمة تهجين جزيئات الحامض النووي على الأغشية وتهجينها مع مجسات خاصة. ويمكن أن يُطبّق هذا الإجراء أيضاً على المستعمرة البكتيرية أو الفاجية.

إن أول من طوّر هذه التقنية هو إد سوذرن Ed Southern وبذلك نُسبت إليه هذه التقنية وسُمّيت بوصمة سوذرن (Southern blotting)، وتشمل تعريض قطع الـDNA المُنتجة من الهضم الإنزيمي إلى الترحيل الكهربائي في هُلام الأجاروز، ثمّ



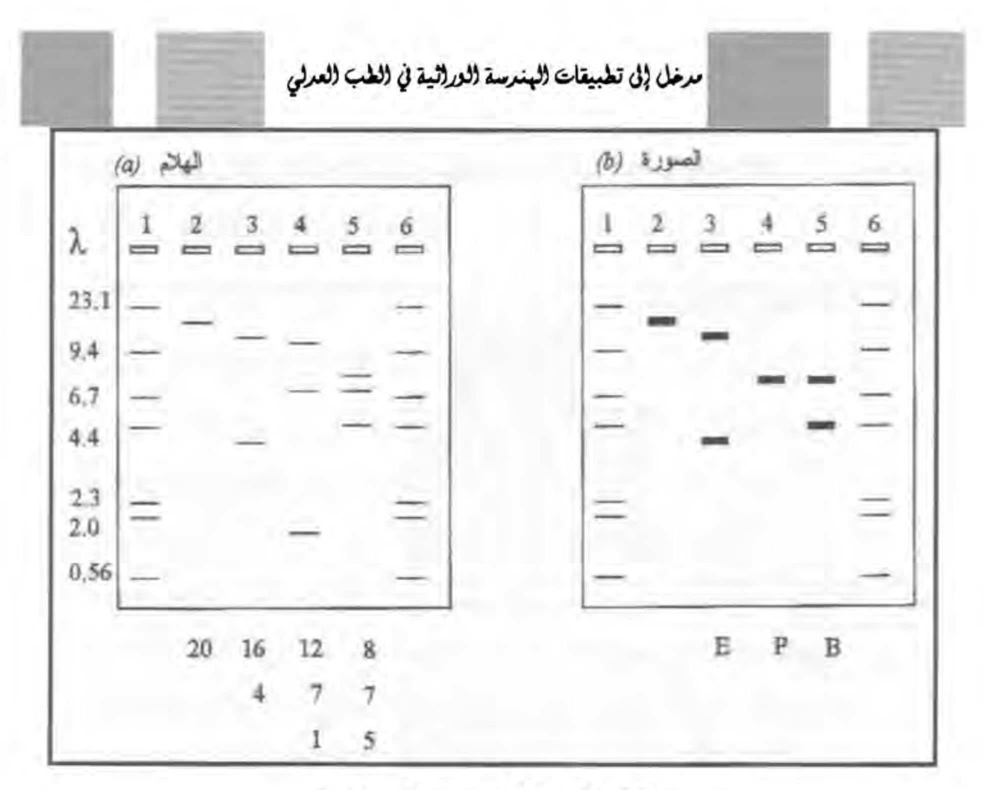
تُنقل القطع المنفصلة إلى غشاء النيتروسيليلوز أو النايلون بإجراء التشريب بالخاصية الشعرية كما هو مبيّن في الشكل (6 – 26).



شكل (6 – 26). جهاز الوصمة (Blotting apparatus)

يوضع الهلام على ورق ترشيح، ثمّ يوضع عليه غشاء النيتروسيليلوز أو النايلون، ثمّ توضع عليه طبقات أخرى من ورق النشاف، إذ يمر المحلول المنظم خلال الهلام عن طريق الخاصية الشعرية، ومن ثمّ تُنقل أجزاء الحامض النووي من الهلام لتُطبع على غشاء التهجين.

عندما تتشرّب القطع وتُطبع على الغشاء تكوّن صورة مُكرّرة ثمّ يُهجّن الغشاء مع مجس إشعاعي بطريقة تهجين المستعمرات نفسها أو الهالات الفيروسية، وبعد التهجين يُغسل الغشاء ويُعرّض إلى فلم أشعة سينية للتصوير الإشعاعي الذي يُبرز المعلومات المُتعلّقة بالنسيلة (Clone) المُستهدفة (شكل 6 – 27).



شكل (6 – 27). وصمة سوذرن

نستعمل في هذا المثال قطعة DNA افتراضية حجمها 20 كيلو قاعدة من نسخة الجينوم ونسخة من الـmRNA كمجس:

(a) نمط القطع المتكونة نتيجة المعاملة بإنزيمات مختلفة.

(b) صورة تصوير إشعاع ذاتي ناتجة عن التهجين.

المجالان 1 و 6 يحتويان على الـDNA لامدا القياسي المقطوع بالإنزيم *Hin*dIII مع الحزم الناتجة معلمة على الصورة للرجوع إليها، أما القطع السليمة في المجال 2 تُطبع كحزم تُهجّن مع المجس، والأعمدة 3 و 4 و 5 توضح المعاملات الإنزيمية (E) *Eco*RI و (P) *Pst*I و (B) *Bam*HI وحجوم القطع مدونة تحت كل عمود في (a) وتُبيّن نتيجة الصورة تهجين المجس مع حزمتين في حالة المعاملة بالإنزيم *Eco*RI و *Bam*HI لهذا يُفترض أن يكون للقطعة موقعان داخليان لتأثير الإنزيمين. أما المعاملة بالإنزيم *Pst*I فيبين التهجين مع قطعة واحدة فقط حجمها 7 كيلو قاعدة، وهذه القطعة مرشّحة لإجراء عملية الاستنسال الثانوي، وقد يقع الجين بالكامل فيها.

فضلاً عن بساطة فكرة تقنية الوصمة، فهي تُعدّ أيضاً طريقة سهلة وكافية لتحليل الجين، ويمكن استعمالها مع الـRNA، ونظراً لأنها عكس الـDNA، لذلك أُطلق عليها وصمة نوذرن (Northern blotting) التي تستعمل في تحديد نمط التهجين الجزيئي لعينات الـmRNA، كما يمكن أن تستعمل لتحديد مناطق الـDNA التي تتهجّن مع الـmRNA.

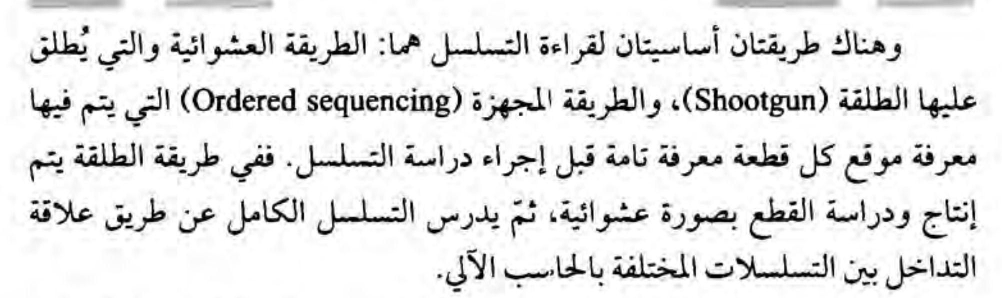
هناك أيضاً إجراءان آخران في موضوع الوصمة، وهما:

1. لا تتعرض فيه عينات الحامض النووي إلى الترحيل الكهربائي، بل توزّع كبقع على الأغشية، وتُهجّن سواءً بوصمة Southern أو Northern، ولهذا يُعرف الإجراء بوصمة البقعة (Dot-blotting)، وهو إجراء مفيد ومعروف للحصول على المعلومات الهامة لدراسة التعبير الجيني.
2. يُعرف بوصمة ويسترن (Western blotting) ويشمل نقل جزيئات البروتين بالترحيل الكهربائي إلى الأغشية، ومن ثم يُجس الغشاء بجسم مضاد لاكتشاف البروتين المُستهدف بطريقة الكشف المناعي للهالات الفيروسية المُنتقاة نفسها عند دراسة تعبير جينات المكتبة الجينومية.

دراسة تسلسل الـDNA (DNA sequencing):

لقد أصبح هذا الموضوع الآن إجراءً عادياً لأيّة عملية استنسال في معظم المختبرات، إذ إن دراسة تسلسل الـDNA يقدم معلومات كثيرة ومفيدة عن الجينات ومناطق التحكّم بها، وإبراز المظاهر الأخرى مثل التسلسلات البينية (Intervening sequences) وغيرها، ولهذا فإن التوصيف الكامل الذي يشمل تحليل التسلسل يُعدّ الآن أمراً مهماً وضرورياً.

تعتمد خطة قراءة التسلسل أو تحليله على عدد من العوامل منها: طول القطعة المُستهدفة بالدراسة، فمثلاً عند دراسة سلسلة طولها يتراوح من 300 إلى 400 كيلو قاعدة، نحتاج إلى معاملات عديدة ومختلفة، أما إذا كان الـDNA يتكوّن من عدّة مئات من القواعد الثنائية فقد يُدرس في خطوة واحدة فقط.



وهناك طريقتان أساسيتان لقراءة التسلسل هما: الطريقة العشوائية والتي يُطلق عليها الطلقة (Shootgun)، والطريقة المجهزة (Ordered sequencing) التي يتم فيها معرفة موقع كل قطعة معرفة تامة قبل إجراء دراسة التسلسل. ففي طريقة الطلقة يتم إنتاج ودراسة القطع بصورة عشوائية، ثمّ يدرس التسلسل الكامل عن طريق علاقة التداخل بين التسلسلات المختلفة بالحاسب الآلي.

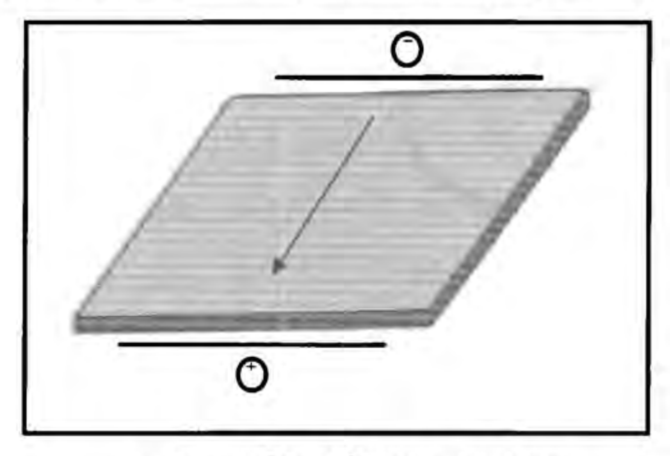
ومن الواضح أن الطريقة المجهّزة أجدى بكثير من طريقة القطع العشوائية، فضلاً عن أن هناك طرقاً عديدة لإنتج قطع محددة مثل إنتاج سلسلة من النسائل الثانوية (Sub-clones) التي يُلغى أو يُحذف منها التسلسل المُستهدف عن طريق الإنزيمات القاطعة، ولكن يبقى فوق كل ذلك ضرورة توفير خريطة إنزيمية كاملة للنسخة الأصلية بحيث يمكن تعيين القطع المناسبة، ومن ثمّ يُجرى لها استنسال ثانوي في ناقل مُعد خصيصاً لهذه الدراسة مثل الناقل pBluescript أو M13، ويُدرس تسلسل كل نسيلة ثانوية لوحدها باتّباع طريقة Dideoxy إذ يُقرأ شريطا الـDNA كلٌ على حدة لكي يتم اكتشاف أي شذوذ، ومن ثمّ القراءة عن طريق الحاسب الآلي.

إن إستراتيجية اختيار الطريقة الملائمة مهمة في إعطاء المعلومات الدقيقة عن القطع المكلونة، لذلك أصبحت دراسة قطع الـDNA من الخطوات المهمة جداً في تقنيات الجين.

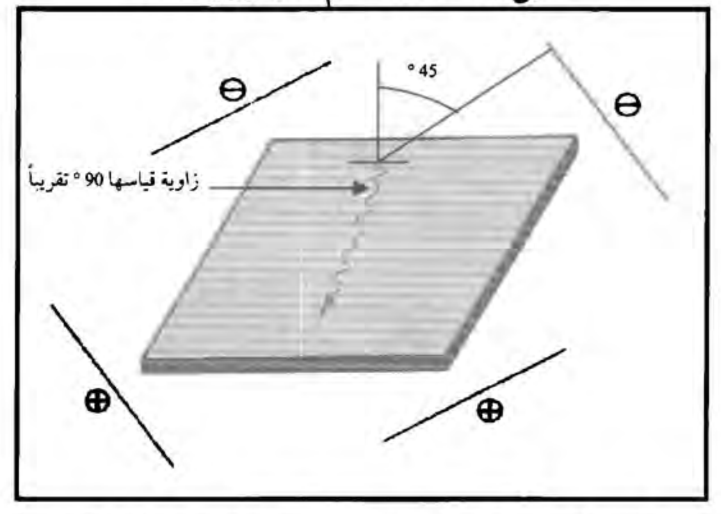
فصل الكروموسومات بالترحيل الكهربائي:

إن أول ما يتم التفكير به لتحديد موقع الجين المطلوب هو معرفة الكروموسوم الذي يقع عليه هذا الجين. ويتم ذلك بنوع خاص من تهجين سوذرن دون اللجوء للخريطة الإنزيمية. وباستعمال كروموسومات سليمة يتم عزلها بإجراء ترحيل كهربائي خاص. ففي الترحيل الكهربائي العادي يُمرّر التيار الكهربائي خلال الهُلام وتُرحّل جزيئات الـDNA في خط مستقيم باتجاه القطب الموجب (شكل 6 – 28) بحيث يمكن فصل الأحجام المختلفة بناءً على المسافات التي ترتحلها خلال الهُلام. ولكن هذا الإجراء لا يصلح إلاّ للأحجام الجزيئية الصغيرة وليس للأحجام الكبيرة وخصوصاً التي يفوق حجمها الجزيئي 50 Kbp والتي يستعمل لها حقل كهربائي خاص مصمم يُطلق عليه الترحيل الكهربائي الهُلامي متناوب الحقل المتعامد OFAGE

(Orthogonal Field Alteration Gel Electrophoresis)، إذ يتناوب التيار بين زوجين من الأقطاب، كل زوج يصنع زاوية مقدارها 45° وينتج عن ذلك تيار نبضي تتحرّك بموجبه الجزيئات في حركة نبضية وتغيّر اتجاهها بناءً على اتجاه التيار، بحيث يتناوب الحقلان بطريقة منتظمة، ويترتّب عليه حركة الـDNA في الهُلام تبدأ من أحد الأطراف إلى الطرف الآخر في خط مستقيم إلى حدٍّ ما، ولكن مع كل تغيّر في اتجاه الحقل الكهربائي يمر كل جزيء بزاوية 90° قبل أن يستأنف ترحيله (شكل 6 – 29).



شكل (6 – 28). هُلام الأجاروز المعتاد



شكل (6 – 29). الترحيل الكهربائي بطريقة OFAGE

وتُعدّ هذه الخطوة الركيزة في هذا الإجراء، وفيها يُعدّل الجزيء القصير اتجاهه أسرع من الجزيء الطويل، ومن ثمّ يتقدّم الجزيء القصير باتجاه نهاية الهُلام بسرعة أكثر، وتتكوّن مسافات واضحة، بحيث يمكن فصل الجزيئات الكبيرة مثل كروموسومات الخمائر والفطريات الخيطية والأوليات (Protozoa) مثل طفيلي الملاريا (*Plasmodium falciparum*).

وتُعدّ تقنية الـOFAGE والطرق الشبيهة الأخرى مثل إجراء الحقول الكهربائية الكنتورية المتشابهة CHEF (Contour clamped homogeneous electric field) وFIGE (Field invasion gel electrophoresis) من الإجراءات المهمة للأسباب الآتية:

1. يمكن تنقية DNA الكروموسوم من الهُلام وعمل سلسلة من المكتبات الجينية. وكل مكتبة من هذه المكتبات تحتوي على الجينات الممثلة لكروموسوم واحد، وتكون بلا شك صغيرة وسهلة التداول مقارنةً بالمكتبة الجينومية الكاملة.
2. يمكن نقل جزيئات الـDNA الكروموسومي إلى غشاء التهجين عن طريق نقل سوذرن (Southern transfer) وإجراء التهجين (Hybridization analysis) للتعرّف على الكروموسوم الذي يحمل الجين.

التباين في أطوال قطع التقييد RFLP

Restriction fragment length polymorphism

الـRFLP (ويُلفظ رفلب Rif-lip) هو التباين في تسلسل DNA الجينوم، والذي يُمكن تحديده من خلال تقطيع الـDNA إلى أجزاء بالإنزيمات القاطعة، وتحليل حجم القطع بوساطة الترحيل الكهربائي.

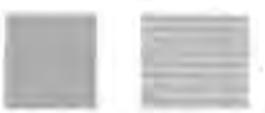
إن دراسة التغاير في الـRFLP يُعدُّ وسيلة مهمّة في رسم الخرائط الجينومية، ومعرفة مواقع جينات الأمراض الوراثية، وتحديد خطورة المرض، وإجراء البصمة الوراثية، واختبارات الأبوّة، والحالات الجنائية، من خلال تحديد مصدر عينة الـDNA، فضلاً عن ذلك يستعمل RFLP في تحديد الحالة المرضية للفرد وتوصيف التغايرات الوراثية وأنماط التربية في المجاميع الحيوانية، وفي قياس معدلات إعادة التشكيل

(Recombination)، والتي يمكن أن تُفضي إلى رسم الخرائط الوراثية والمسافة الوراثية بين مواقع (Loci) RFLP محسوبة بالسنتيمورجان (CentiMorgan)، ويُستعمل أيضاً في دراسات تعقّب الأسلاف خلال التطوّر والهجرة، إذ قد تحصل تنوّعات في الطفرات تؤثّر في جزيئات الـDNA بطرق مختلفة.

يُشير مُصطلح التباين (التنوّع Polymorphism) إلى الاختلافات الطفيفة بين الأفراد في تسلسلات أزواج القواعد للجينات المُشتركة، وعلى الرغم من أن كل أفراد النوع الواحد يمتلكون بشكلٍ أساسي البنية الوراثية نفسها، فإن هذه الاختلافات الطفيفة تتمثّل في الاختلافات المظهريّة (سواء كان المظهر الخارجي أو الأيض... الخ) بين ألأفراد.

تتضمّن طريقة العمل قطع مناطق مُعيّنة من الـDNA ذات تغاير معروف بالإنزيمات القاطعة، ثمّ فصل القطع المتكوّنة بوساطة الترحيل الكهربائي على هُلام الأجاروز، وإجراء وصمة سوذرن، وتحديد عدد القطع والحجوم النسبية، إذ يمكن أن يختلف نمط القطع من فردٍ لآخر.

وهنا يمكن أن يستعمل التحليل الذي يقيس قطع الـDNA التي تحتوي على تسلسلات قصيرة مختلفة من شخصٍ لآخر، أو ما يُسمّى بالـVNTRs. فبعد استخلاص الـDNA من العينة وتضخيمها بالـPCR، تُضاف إنزيمات قاطعة تقطع في نقاط مُعيّنة من الـDNA، وتُطبّق وصمة سوذرن، ويتم تحديد عدد المرّات التي تتكرّر بها الـVNTRs، فإذا ظهرت عينتان مختلفتان بسبب اختلاف أطوال VNTRs فهذا يعني أنهما لا تعودان للشخص نفسه. من جهةٍ أخرى إذا احتوت العينتان على أطوال VNTRs نفسها، فإنه من الممكن أن تعودان للشخص نفسه أو لشخصين يمتلكان VNTRs بالطول نفسه في ذلك الموقع. وعليه لا بُدَّ هنا من استعمال VNTRs كافية من الفردين، وذلك لتقليل احتمالية التوافق التطابقي إلى ما يُقارب الصفر. ومن الجدير بالذكر أن RFLP يحتاج إلى خطوات كثيرة، كما أن فترة إنجازه طويلة نسبياً، لذلك قد يُستعاض عنه بتقنيّات أحدث وأسرع.



وقد ذكرنا أعلاه التركيز على RFLP لاستغلاله في تقديم معلومات قيّمة في مجالات بيولوجية مختلفة، وربما كان جُلّ الاهتمام قد تركّز على:

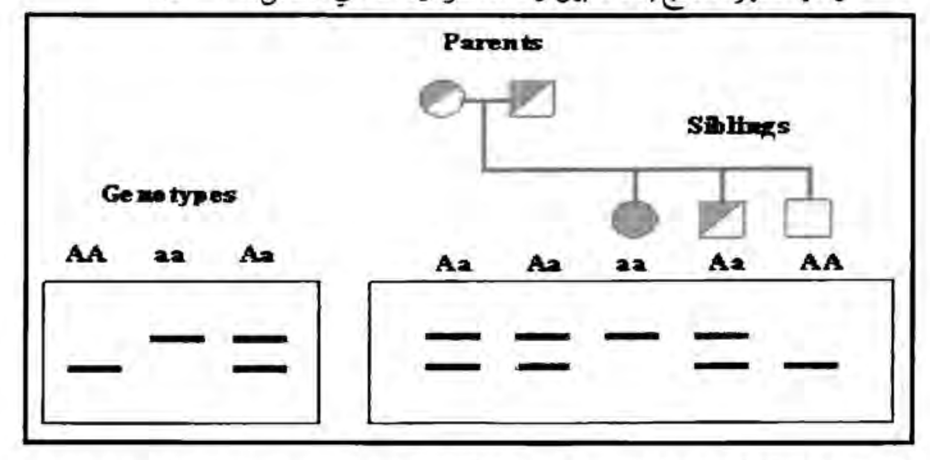
1. مسح وتنقيب DNA الإنسان حول وجود جينات ضارّة بالصحة.

2. تقديم دليل البراءة أو الاتّهام في المشاكل الجنائية باستعمال بصمة الـDNA.

في المثال التالي (شكل 6 – 30) يتبيّن بأن هنالك قطعة صغيرة من الجينوم يمكن تحديدها بالمجس (الخط السميك). ففي الأليل A يُقطع الجينوم بوساطة الإنزيم القاطع في ثلاثة مواقع متقاربة (مؤشّرة بالمثلثات)، ولكن سوف تظهر فقط القطعة الواقعة على أقصى اليمين بوساطة المجس. وفي الأليل a يُفقد موقع القطع الثاني بسبب طفرة وراثية، ولذلك فإن المجس يُحدّد قطعة أكبر مُندمجة تبدأ من الموقع 1 إلى الموقع 3.

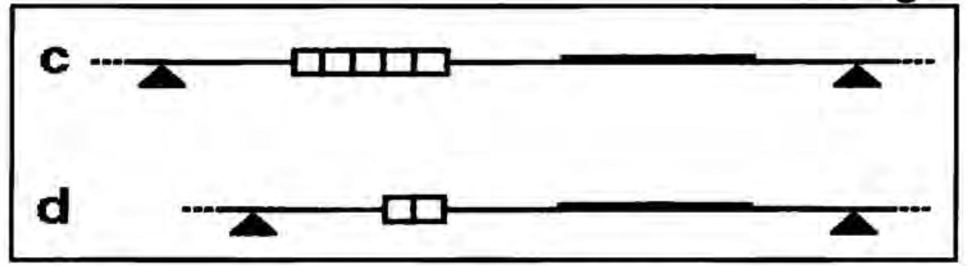
شكل (6 – 30). اختلافات عدد مواقع القطع في أليلين

وعليه تظهر النتائج بعد تطبيق وصمة سوذرن كالآتي (شكل 6 – 31):



شكل (6 – 31). اختلاف عدد الحزم المتكوّنة في تراكيب وراثية مختلفة بعد إجراء وصمة سوذرن بسبب اختلاف الـRFLP

وفي المثال أدناه (شكل 6 – 32)، فقد تمّ اختيار المجس والإنزيم القاطع لتحديد منطقة من الجينوم تتضمّن تغاير في VNTR (مؤشّرة بهيأة صناديق). ففي الأليل c هنالك خمس مُكرّرات في الـVNTR والمجس يُحدّد قطعة أطول بين موقعي القطع. أما في الأليل d هنالك فقط متكررتان منها. وعليه يُحدّد المجس قطعة أصغر بين موقعي القطع نفسهما.



شكل (6 – 32). اختلاف الطول في الحزم الواقعة بين موقعي القطع بسبب اختلاف عدد المتكررات من الـVNTR

مع العلم بأن هنالك عمليات وراثية أخرى مثل الاندغامات (Insertions)والحذوفات (Deletions) والانتقالات (Translocations) والانقلابات (Inversions) تؤدّي أيضاً إلى RFLP.

ويُبيّن الشكل (6 – 33) التباين بين عينتين بسبب اختلاف عدد مواقع القطع، إذ تظهر في العينة1 ثلاث حزم، وفي العينة 2 حزمتين.

شكل (6 – 33). اختلاف عدد الحزم المتكوّنة في عينتين بسبب اختلاف مواقع القطع

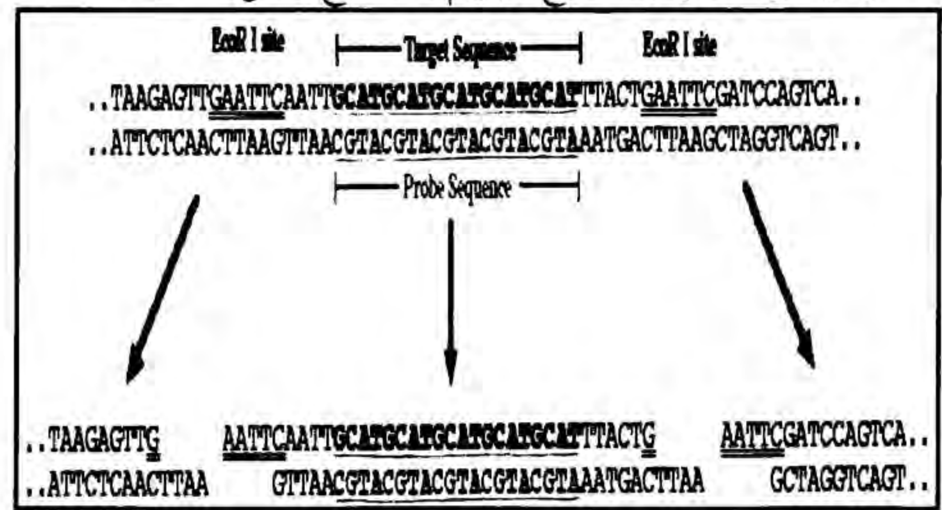
تكوين الـRFLP:

يتوارث كل فرد الـDNA الخاص به من أبويه، وطالما أن الـDNA يتضاعف خلال كل جيل، فإن أي تسلسل مُعيّن يمكن أن يُمرّر إلى الجيل التالي. إن الـRFLP هو تسلسل من الـDNA يمتلك موقع قطع على كل نهاية من نهايتي التسلسل الهدف (Target sequence) بحيث ينحصر هذا التسلسل بينهما. ويُعرف التسلسل الهدف بأنه أي قطعة من الـDNA ترتبط بالمجس من خلال التزاوج القاعدي.

فلو تتبّعنا RFLP مُعيّن يمكن التعرّف عليه بوساطة الإنزيم *Eco*RI والتسلسل الهدف المُكوّن من 20 قاعدة:

GCAT GCAT GCAT GCAT GCAT

وعليه سوف تتكوّن بعد القطع بالإنزيم ثلاث قطع (شكل 6 – 34).



شكل (6 – 34). تتكوّن ثلاث قطع بعد التقطيع بالـ*Eco*RI، ولكن يمكن أن تتهجّن قطعة واحدة فقط مع المجس، وهي القطعة الهدف

ولو نظرنا إلى السيد جاك والسيدة جيل وقطع الـDNA التي يحملونها، والتي تحتوي على RFLP (للتوضيح سوف نُبيّن أحد أشرطة الـDNA) (شكل 6 – 35). وطالما أن كلا الشخصين ثنائي المجموعة الكروموسومية، فسوف يمتلكان نسختين من هذا الـRFLP. وعليه عندما نختبر النسخة الأولى لكل من جاك وجيل يتبيّن بأنهما متماثلان.

Jack 1: G↓AATTC—(8.2kb)—GCATGCATGCATGCATGCAT—(4.2kb)—G↓AATTC-

Jill 1: G↓AATTC—(8.2kb)—GCATGCATGCATGCATGCAT—(4.2kb)—G↓AATTC-

شكل (6 – 35). تماثل الشخصين بوجود قطعة واحدة (12.4 kb) تحصر الـDNA الهدف في وسطها

ولكن عند اختبار النسخة الثانية لهذا الـRFLP نُلاحظ بأنهما غير متماثلان (شكل 6 – 36)، إذ إن نسخة جاك الثانية (Jak-2) تفقد موقع القطع بالـ*Eco*RL والذي يتواجد في نسخة جيل الثانية (Jill-2) عند مسافة 1.2 kb فوق مجرى الجين بالنسبة للتسلسل الهدف (الاختلافات مؤشّرة بالحروف المائلة ومرسوم تحتها خط).

Jack 2: G↓AATTC—(1.8 kb)-CCCTTT—(1.2 kb)—

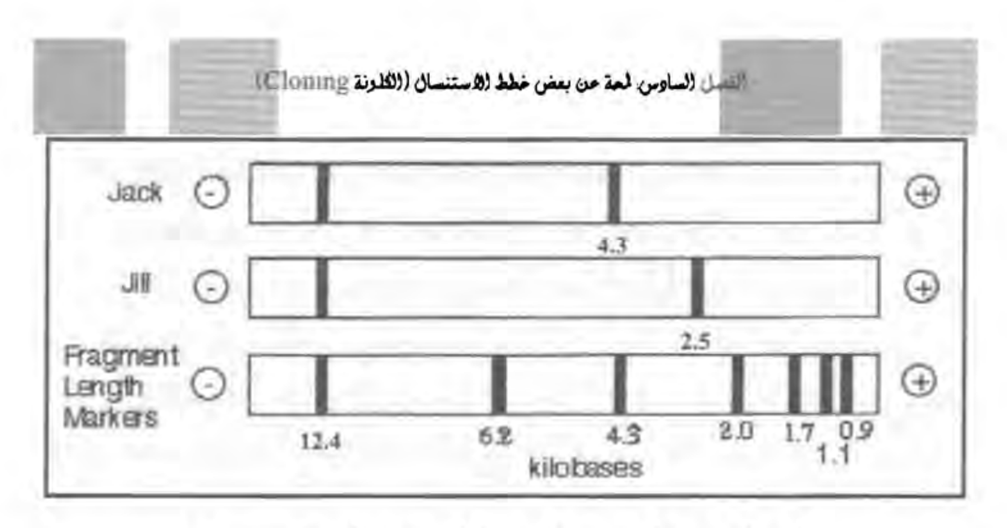
GCATGCATGCATGCATGCAT—(1.3 kb)– G↓AATTC-

Jill 2: G↓AATTC—(1.8 kb)- G↓AATTC—(1.2 kb)—

GCATGCATGCATGCATGCAT—(1.3 kb)– G↓AATTC-

شكل (7 – 36). اختلاف الشخصين بسبب اختلاف مواقع القطع في النسخة الثانية من الجينوم

ولذلك فعند إجراء تحليل الـRFLP لجميع النتائج أعلاه، سوف نلاحظ حزمة واحدة مشتركة (12.4 kb) بين الشخصين ناتجة عن تماثل مواقع القطع في النسخة الأولى، وحزمة أخرى في كل منهما ولكن غير متطابقة، وهي 4.3 kb في جاك محصورة بين موقعي الإنزيم (1.8 + 1.2 + 1.3 kb)، و 2.5 kb في جيل (1.3 + 1.2 kb)، إذ تظهر الحزمة 2.5 kb الخاصة بجيل-2 والحزمة 4.3 kb الخاصة بجاك-2 بعد إجراء وصمة سوذرن مع المجس. في حين لا تظهر الحزمة 1.8 kb الموجودة في جيل-2 لأنها تقع خارج التسلسل الهدف. ونلاحظ النتيجة كما في الشكل (6 – 37).

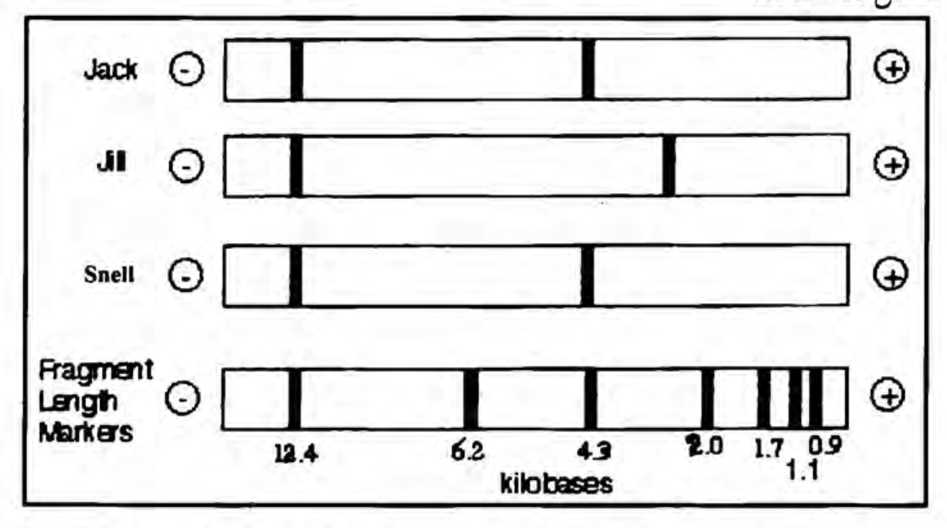


شكل (6 – 37). بصمة RFLP للسيد جاك والسيدة جيل

يشترك الشخصان بالحزمة 12.4 kb، ويتفرّدان بالحزمة 4.3 kb و 2.5 kb لكل منهما على التوالي.

ولتوضيح استعمال الـRFLP في إثبات شرعية الأبوّة، نأخذ المثال الآتي:

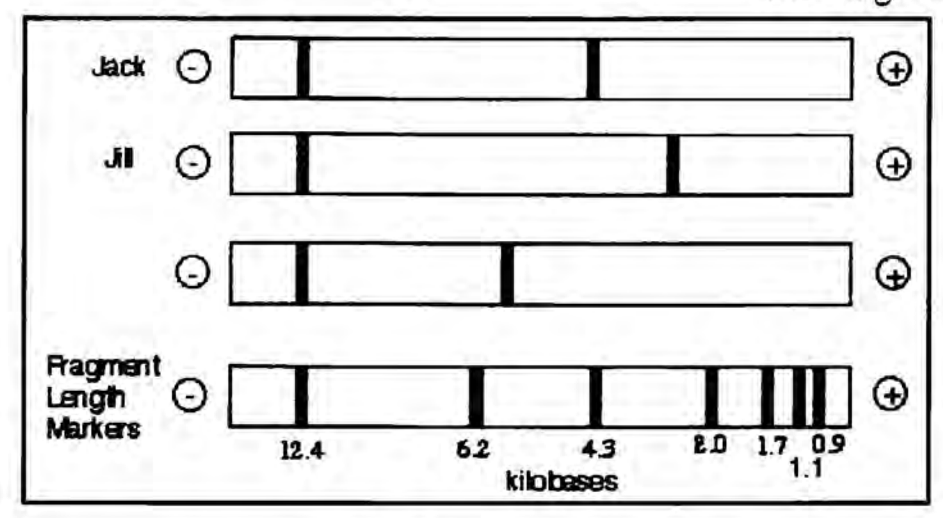
بالاعتماد على المثال السابق، سوف نستعمل تقنية الـRFLP لتحديد كون السيد جاك هو أب لطفل السيدة جيل المُسمّى سنيل، إذ يتم استخلاص الـDNA من خلايا الدم البيضاء للأشخاص الثلاثة المعنيين. وطُبّق تحليل الـRFLP، وكانت النتائج كما في الشكل (6 – 38).



شكل (6 – 38). نتيجة بصمة RFLP للأب المزعوم (جاك) والأم (جيل) والطفل (سنيل)

في هذه الحالة يبدو أن جاك يمكن أن يكون الأب، طالما أن سنيل قد ورث القطعة 12.4 kb من أمه جيل، والقطعة 4.3 kb من جاك. ولكن مع ذلك لا بُدَّ من الانتباه بأنه من الممكن وجود رجل آخر يمتلك نمط RFLP نفسه بالنسبة لجاك، ولكي نكون متأكدين يجب اختبار مواقع جينية أخرى للـRFLP، خصوصاً وأن من الاحتمالات الضعيفة جداً وجود شخصان (عدا التوائم الصنوية) يشتركان بأنماط RFLP متعدّدة، وبذلك نُحقق تأكيد النتائج المطلوبة وبأكبر قدر من الثقة.

وفي سيناريو آخر لها المثال، يمكن أن تكون النتائج مختلفة، بحيث تظهر كما في الشكل (6 – 39).



شكل (6 – 39). نتائج RFLP مختلفة للمثال السابق

في هذه الحالة يمكن القول بأن جاك ليس هو الأب، طالما أن سنيل يمتلك حزمة بحدود 6 kb غير موجودة في جاك، وعليه فإنه من المُرجّح جداً بأن جاك ليس هو الأب، ولكن علينا أن ننتبه إلى احتمالية ظهور هذه الحزمة في سنيل بسبب طفرة وراثية جديدة في هذا الموقع الجيني.

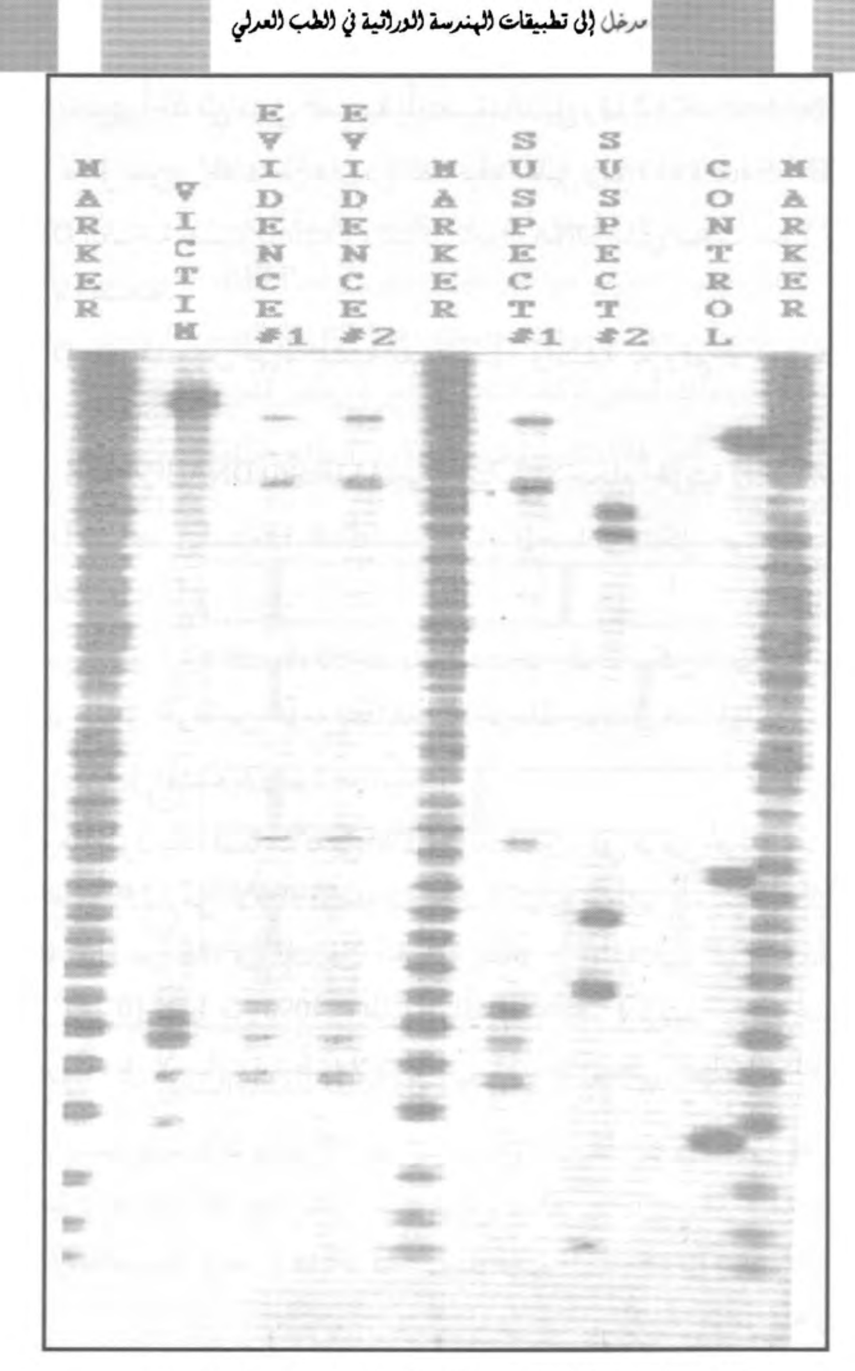
في الشكل (6 – 40) أدناه، نُلاحظ نتائج RFLP لحالة اغتصاب، إذ استعمل فيها مجسين، أحدهما يُظهر الحزم الموجودة في القمة، والآخر يُظهر الحزم الموجودة في القاعدة، وبخصوص عينات الـDNA فقد كانت تتمثّل من:

- سائل منوي أخذ من مهبل الضحية المُغتصبة، الدليل رقم 2 (Evidence #2).
- بقعة سائل منوي رُفعت من ملابس الضحية، الدليل رقم 1 (Evidence #1).
- DNA الضحية نفسها (Victim) للتأكّد بأن الـDNA الذي نبحث عنه لم يأتِ من خلايا الضحية.
- DNA من مُشتبهين بهما، المُشتبه به رقم 1، والمُشتبه به رقم 2 (Suspect #1 وSuspect #2).
- طقم من قطع الـDNA المختلفة الحجوم، لقياس الأحجام الجزيئية (Marker).
- DNA لشخص مُستبعد، للتأكّد من عمل المجسات بشكل صحيح، كسيطرة (Control).

من خلال قراءة النتيجة، نلاحظ بأن المُشتبه به رقم 2 يمكن استبعاده، خصوصاً وأنه لا توجد أي حزمة من حزمه متطابقة مع الحزم الموجودة في السائل المنوي.

ولكن هل المُشتبه به رقم 1 هو المُذنب؟

وهنا نقول بأننا لسنا متأكّدين 100٪. وللتخمين، على فرض أن أليل ما (حزمة) قد يتواجد في 25٪ من الأفراد المفحوصة، فإن احتمالية التطابق العشوائي لأليلين هي $(0.25)^2$ أو 1 من 16. ولذلك فإن احتمالية تطابق 6 الأليلات، كما في هذه الحالة، تساوي $(0.25)^6$ أي 1 من 4096. وطالما أن المُشتبه به رقم 1 لم يتم اختياره عشوائياً في هذه الجريمة، بل لأسباب ترتبط بعلاقته بالجريمة، لذلك يمكن القول بأن دليل الإدانة هنا قوياً.



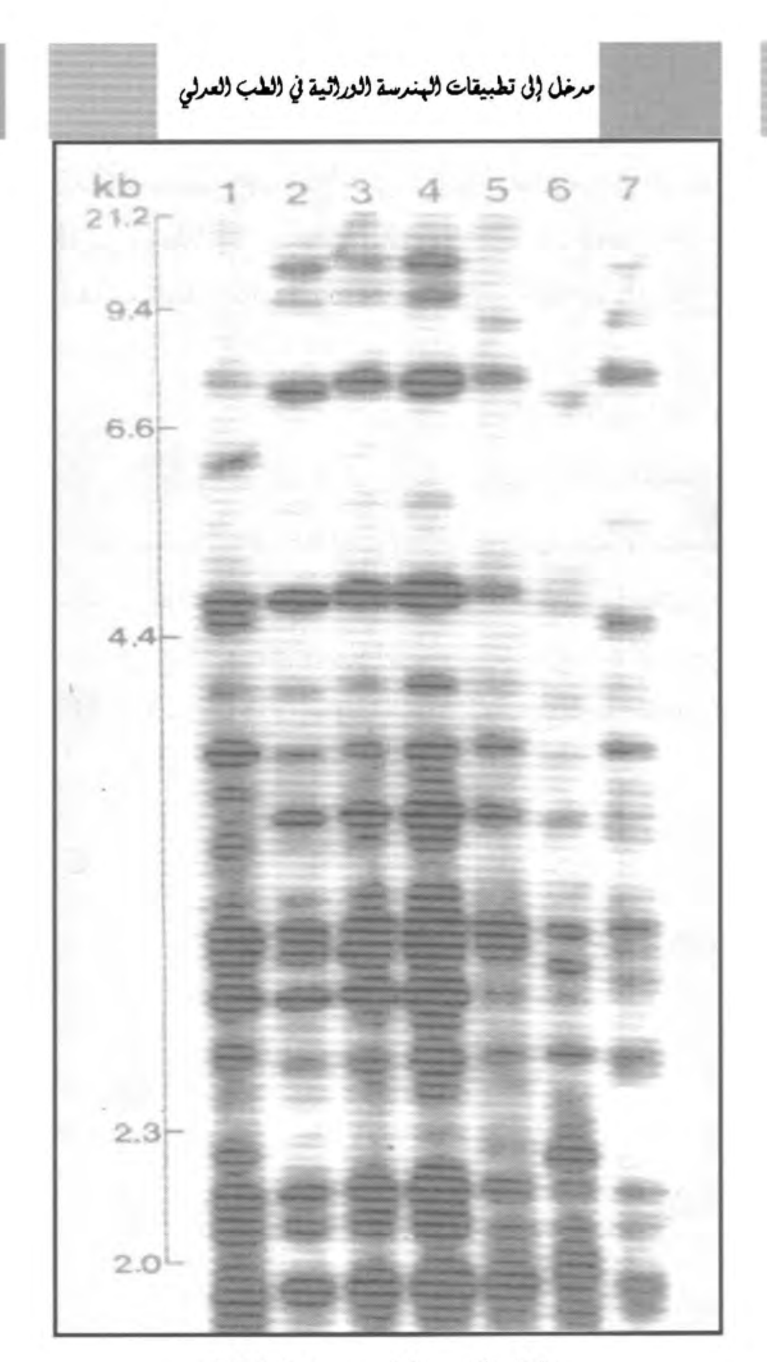
شكل (6 – 40). نتائج اختبار **RFLP** لجريمة اغتصاب

ولكن للتأكّد نستعمل مجسات أخرى لزيادة الدقّة، ومن ثمّ التوصّل ودون شك إلى المجرم الحقيقي، فمثلاً إذا استعمل طاقم من المجسات يُعطي 14 حزمة لـDNA المُشتبه به متطابقة مع عينة السائل المنوي، فإن احتمالية الخطأ تقل إلى أقل من 1 من 268 مليون، أي أنه:

$$(0.25)^{14} = {}^{1}/_{268,\,435,\,456}$$

وهذا أكثر من مجموع سكّان الذكور والإناث في الولايات المتحدة الأمريكية.

هذا وقد استعملت الـRFLPs أيضاً في الحدِّ من عمليات الاصطياد غير المشروع وإبادة الحيوانات البرية التي تدرُّ أرباحاً طائلة للصيادين. ففي إحدى الحوادث ادّعى الصياد بأن قرون حيوان الأيّل (Moose) التي بحوزته تعود لحيوانٍ واحدٍ فقط، ولكن بصمة الـRFLPs كشفت بأن هذه القرون تعود لأربعة حيوانات (شكل 6 – 41).

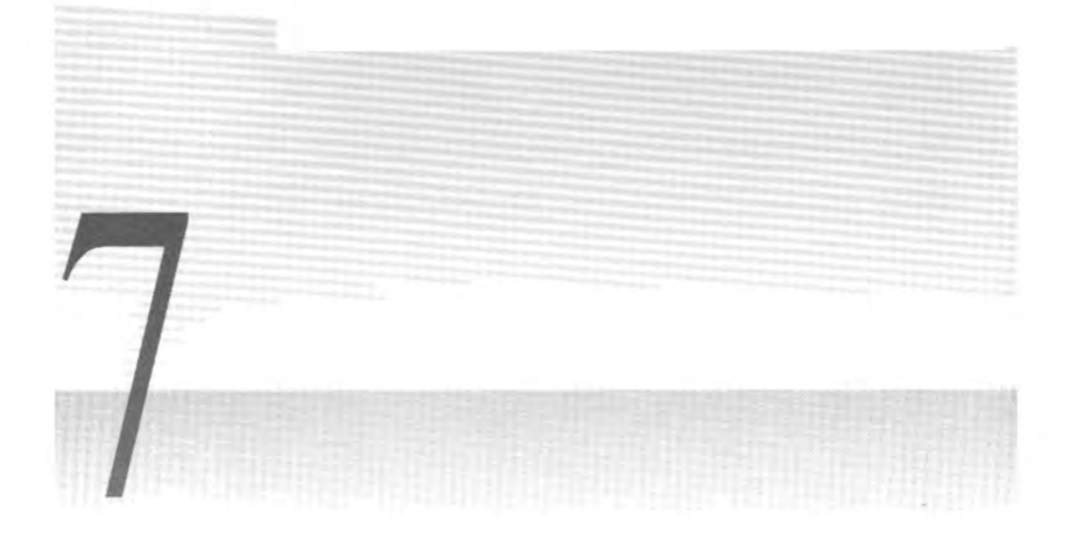


شكل (6 – 41). بصمة RFLP

أثبتت هذه البصمة بأن هنالك أربعة أيائل مختلفة. المجالات 2 ، 3 ، 4 تعود لإحدى العينات، المجالات 5 ، 6 ، 7 تعود للعينات الثانية والثالثة والرابعة. المجال 1 يمثّل DNA لقياس الأحجام الجزيئية.

الفصل السابع

تباين الـDNA وأنواع المجسات المستعملة في العلوم الجنائية



الفصل السابع

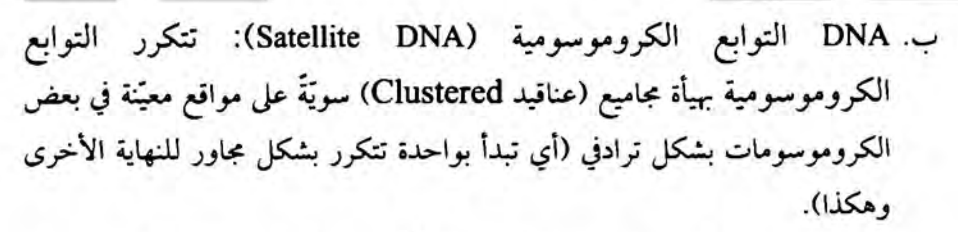
تباين الـDNA وأنواع المجسات المستعملة في العلوم الجنائية

أنواع الـDNA (Types of DNA):

على الرغم من أن أغلب التركيز انصبَّ على الـDNA المُشفَّر إلى بروتينات، فإنه من المهم ملاحظة أن أقل من 10٪ (بحدود 3 مليون زوج نيوكليوتيدي) في جينوم الإنسان في واقع الأمر تؤدي وظيفة التشفير البروتيني. كما وأن أغلب مادتنا الوراثية غير معروفة الوظيفة، ولسهولة فهم كل أنواع الـDNA فقد قُسّم إلى ثلاثة أنواع (شكل 7 – 1) هي:

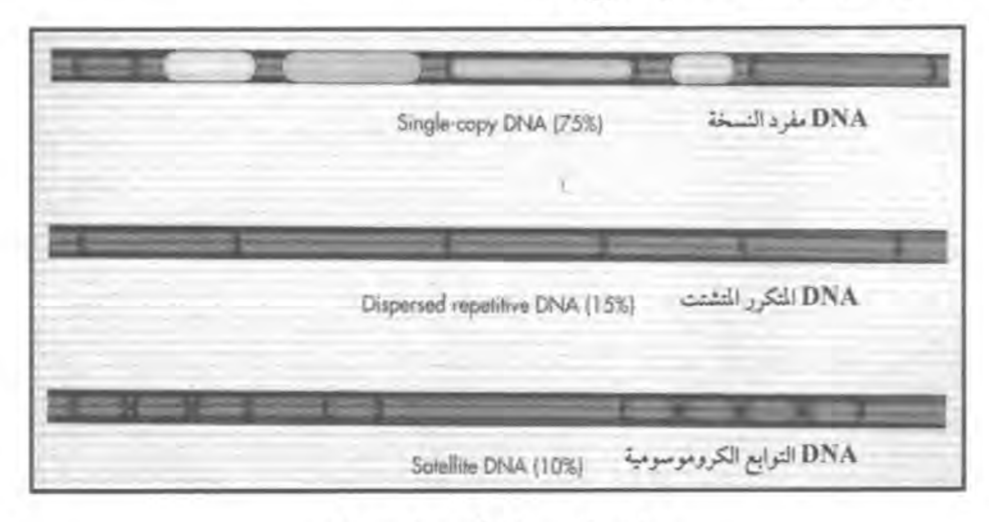
1. النوع الأول وهو الأكثر شيوعاً أو ما يُسمّى بالـDNA مفرد النسخة (Single-copy DNA)، وكما يُشير الاسم فإنه يمثّل تسلسلات الـDNA الموجودة مرة واحدة، أو في أحيان قليلة أكثر من مرة، في الجينوم، إذ تُشكّل النسخ المفردة ما يُقارب 75٪ وتشمل الجينات المُشفَّرة للبروتين (Protein-coding genes)، ورغم ذلك فإن الـDNA المُشفَّر إلى بروتينات يمثّل نسب قليلة في كل الـDNA المفرد النسخة، والأغلبية الباقية تقع في الأنترونات (Introns: التسلسلات غير المُشفَّرة)، أو تقع في تسلسلات الـDNA الواقع بين الجينات.
2. المتبقّي من النسبة والبالغ 25٪ من الجينوم يتكوّن في الـDNA المتكرر (Repetitive DNA)، وهي تسلسلات تتكرر بكثرة في الجينوم، وغالباً آلاف المرات، ويُصنّف هذا النوع إلى صنفين رئيسيين:

أ. الـDNA المتكرر المتشتت (Dispersed repetitive DNA): يكون متناثر بشكل مفرد على طول الجينوم، ولا يكون مترادف.



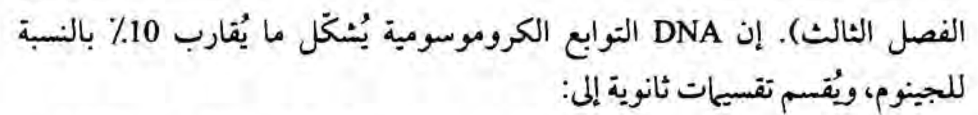
ب. DNA التوابع الكروموسومية (Satellite DNA): تتكرر التوابع الكروموسومية بهيأة مجاميع (عناقيد Clustered) سويةً على مواقع معيّنة في بعض الكروموسومات بشكل ترادفي (أي تبدأ بواحدة تتكرر بشكل مجاور للنهاية الأخرى وهكذا).

إن مصطلح توابع كروموسومية قد اشتُقّ من كون حقيقة تركيب هذه التسلسلات، إذ يمكن فصلها بسهولة بوساطة الطرد المركزي باستعمال تدرّج الكثافة بمحلول كلوريد السيزيوم CsCl (Cesium chloride)، إذ يبدو الـDNA بهيأة توابع مفصولة عن بقية الـDNA في تدرّج الكثافة .



شكل (7 – 1). أنواع الـDNA

تكون التكرارات المترادفة غنية بالأزواج القاعدية T-A ذات الأواصر الهيدروجينية المزدوجة مقارنةً بالـC-G ذات الأواصر الهيدروجينية الثلاثية، ومن ثمّ فإن كثافة الطفو في متدرّج الـCsCl (بسبب وفرة الأواصر الثنائية على حساب الأواصر الثلاثية) تكون أقل من الحزمة الرئيسية للـDNA التي تستقر في منطقة ذات كثافة طفو أعلى. وهذا المصطلح يجب أن لا يتداخل مع المصطلح الأصلي للتوابع المُلاحظة بوساطة المجهر على بعض الكروموسومات (كروموسومات 13 و 14 و 15 و 21 و 22) والتي تمثّل مناطق تنظيم النويّة NORs (Nucleolar organizer regions) (راجع



الفصل الثالث). إن DNA التوابع الكروموسومية يُشكّل ما يُقارب 10٪ بالنسبة للجينوم، ويُقسم تقسيمات ثانوية إلى:

أولاً: توابع ألفا (Alpha-satellite DNA) والذي يتكرر بشكل ترادفي في 171 زوج قاعدي، ويمكن أن يمتد إلى الملايين في أزواج القواعد أو أكثر طولاً، إذ يتواجد هذا النوع قرب مناطق السنترومير بالنسبة للكروموسومات.

ثانياً: التوابع الصغيرة (Minisatellites) وهي عبارة عن قوالب من التكرارات مترادفة، يكون طولها الكلي أقل بكثير من سابقتها، تتكوّن من تكرارات بطول 100 - 10 زوج قاعدي طولاً، (تُشير بعض المصادر إلى أن طولها ما بين 12 – 100)، ويبلغ طولها الكلي بعض الآلاف في أزواج القوالب أو قريب من ذلك، إذ تتواجد بهيأة مجاميع (عناقيد) يصل عددها إلى ما يقارب 3000 من المتكررات.

تميل التوابع الصغيرة إلى عدم الاستقرار، وأن عدد النسخ للتسلسل المحدّد في الغالب يزداد أو يقل من جيل إلى جيل تالي . ونتيجةً لذلك فإن طول الموقع الأليلي لتابع صغير مُعيّن يتغاير بشكلٍ كبير في المجموعة السكانية، حتى بين أفراد العائلة الواحدة. وبسبب هذا التغاير العالي (Polymorphic) في الطول، فقد استعملت تسلسلاتها في التعرّف على الأشخاص في الجرائم وتحديد الأبوّة.

ثالثاً: التوابع الكروموسومية الدقيقة (Microsatellites) وهي أيضاً صغيرة ولكن وحداتها المتكررة تكون بحدود 2 و 3 و 4 زوج قاعدي طولاً، (تُشير بعض المصادر إلى أن طولها ما بين 1 – 5)، ويبلغ طولها الكلي أقل من بعض المئات من أزواج القواعد. ونموذجياً تتواجد بهيأة مجاميع (عناقيد) صغيرة بحدود 10 – 40 زوج قاعدي طولاً. وتتبعثر التوابع الدقيقة خلال الـDNA، إذ يوجد أكثر من 100000 موقع أليلي لها في جينوم الإنسان.

إن إنزيمات تضاعف الـDNA تعاني من مشاكل في مضاعفة مناطق الجينوم التي تحتوي على هذه التسلسلات المتكررة الصغيرة، وهذا يُسبب تغيراً في طول الـDNA خلال الأجيال. وبسبب التغاير في أطوالها في المجموعة السكانية، فقد استعمل DNA التوابع الدقيقة في تحليل العلاقات بين المجاميع السكانية البشرية الإثنية المختلفة كما هو

المثال التالي: إذ إن عدداً كبيراً من علماء الأنثروبولوجيا (Anthropologists) يزعمون بأن النوع البشري الحديث نشأ من أفريقيا، وإذا كان ذلك صحيحاً فإن أفراد المجاميع السكانية الأفريقية المختلفة يجب أن يُظهروا تغايراً أكثر في تسلسل الـDNA مقارنةً بالمجاميع السكانية التي تقطن أوطان أخرى، وذلك لأن جينوم المجاميع الأفريقية مضى عليه وقت أطول من التشعّب التطوري. وبالفعل فقد دُعمت الفرضية من خلال دراسة الـDNA البشري.

يمتلك النوعان الأخيران من التوابع أهمية كبيرة في الدراسات الوراثية البشرية، كما أنهما مهمّان جداً في دراسة الخرائط الجينية.

أما بخصوص الـDNA المتكرر المتشتت والذي يُشكّل 15٪ من الجينوم، فإن متكرراته تقع في مجموعتين:

أولاً: العناصر المتفرقة القصيرة SINEs (Short interspersed elements).

ثانياً: العناصر المتفرقة الطويلة LINEs (Long interspersed elements).

إذ يتراوح حجم الـSINEs المفردة من 90 - 500 زوج قاعدي، أما الـLINEs فتصل إلى 7000 زوج قاعدي. كما أن أهم أنواع الـSINEs ما يُسمّى بمتكرّرات ألو (Alu-repeats) إذ اشتق مصطلح ألو من كون هذه الوحدات المتكررة بحدود 300 زوج قاعدي تحتوي على تسلسل DNA يمكن قطعه بالإنزيم القاطع ***Alu***. إن متكررات ألو عبارة عن عائلة من الجينات تمتلك DNA شديد التشابه. ينتشر ما يُقارب 300000 - 500000 من متكررات ***Alu*** خلال الجينوم (راجع الفصل الثالث)، إذ تكمن النقطة المهمة لهذه التسلسلات بإمكانية توليد نسخ من نفسها يمكن أن تدخل في أجزاء أخرى في الجينوم، وهذا الاندغام يمكن أن يقع في بعض الأحيان في مناطق الجينات المُشفّرة للبروتينات مُسبباً بعض الأمراض الوراثية.

وقد سميت أيضاً بالتسلسلات الرحّالة أو المتنقلة (Normadic sequences) لقدرتها على الهجرة من موقع إلى آخر في الجينوم، والتي من المعتقد أن تُناظر العناصر القافزة (Transposable elements) في الكائنات بدائية النواة.

إن وظائف الـDNA عالي التكرار الذي يقع على مناطق الكروماتين المتباين (Heterochromatic regions) الغير نشطة وراثياً في الكروموسومات غير واضحة تماماً، ولكن الافتراضات المطروحة حول هذه الوظائف رغم الحاجة إلى البحث والتأكّد اشتملت على:

1. أدوار تركيبية أو تنظيمية في الكروموسومات.
2. اشتراكها في ازدواج الثنائيات الكروموسومية أثناء الانقسام الاختزالي.
3. اشتراكها في عملية العبور الوراثي (Crossing over) أو إعادة التشكيل الجيني (Recombination).
4. أدوار حماية للجينات التركيبية المهمة مثل جينات الهستونات، وجينات الـrRNA أو جينات البروتينيات الرايبوسومية.

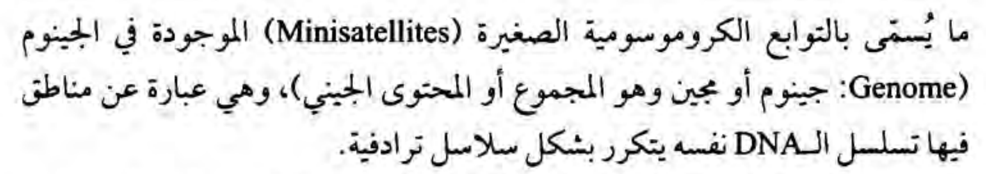
كما يعتقد بعض الباحثين بأن لها أدوار تنظيمية في عملية التعبير الجيني (Gene expression) خصوصاً وأن تسلسلات الـDNA متوسطة التكرار (رغم أن التسلسلات عالية التكرار أو متوسطة التكرار لا تُستنسخ ولا تُترجم) تقع بمحاذاة الجينات التركيبية (الجينات الفعّالة المُشفّرة إلى بروتينات) المتمثّلة بالـDNA مفرد النسخ.

التغايرات التي يُعتمد عليها في إجراء البصمة الجينية:

1. البصمة المعتمدة على التغاير العددي في تنوعات التكرارات المترادفة

Variable number of tandem repeat polymorphisms

إن الأسلوب المستعمل في العادة لتحديد وجود أو غياب موقع قطع إنزيمي يُسمّى تباينات أو تنوعات منطقة القطع RSPs (Restriction site polymorphisms). وفي هذه الحالة، فإن هذا التنوع سوف يمتلك أليلين ممكنين يحتلان جزءاً محدداً من كمية التنوع الوراثي (Genetic diversity) يمكن ملاحظته. كما يمكن ملاحظة تنوّع أكثر إذا كان نظام التباين يمتلك أليلات كثيرة وليس اثنين فقط، والتباين في أسلوب الـRFLP يُعطي مثل هذه الحالة تماماً. كما أن هذا التغاير الخاص يُستثمر فيه



ما يُسمّى بالتوابع الكروموسومية الصغيرة (Minisatellites) الموجودة في الجينوم (Genome: جينوم أو مجين وهو المجموع أو المحتوى الجيني)، وهي عبارة عن مناطق فيها تسلسل الـDNA نفسه يتكرر بشكل سلاسل ترادفية.

تتكوّن تجمعات التوابع الصغيرة نموذجياً من 10 – 100 من النيوكليوتيدات، كما هو الحال في الشكل (7 – 2).

<u>5′– GACTGCCTGCTAAGAT GACTGCCTGCTAAGATC</u>

<u>GACTGCCTGCTAAGAT GACTGCCTGCTAAGATCT</u>

<u>GACTGCCTGCTAAGAT GACTGCCTGCTAAGATAA</u>

<u>GACTGCCTGCTAAGAT GACTGCCTGCTAAGATGA</u>

<u>TGACTGCCTGCTAAGAT – 3′</u>

شكل (7 – 2). تجمعات (عناقيد) التوابع الصغيرة

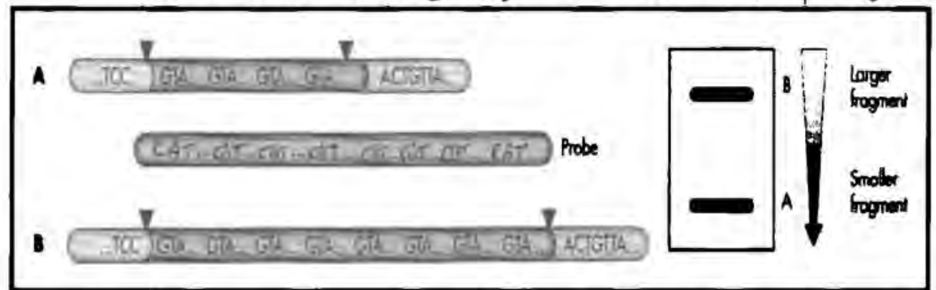
فهو يتكوّن من 9 متكررات مترادفة (موشّر تحتها خط) تتشكّل من 16 زوج قاعدي للتسلسل: GACTGCCTGCTAAGAT. هذا مع العلم بأن بعض الدراسات أشارات إلى أنها تتكوّن من مجاميع من النيوكليوتيدات يتراوح طولها من 2 – 100 نيوكليوتيدة. فعلى سبيل المثال التسلسل

<u>GGAAG</u> <u>GGAAG</u> <u>GGAAG</u> <u>GGAAG</u>

يتكوّن من أربع متكررات مترادفة من 5 نيوكليوتيدات، وأشارت أيضاً بأن التكرار النموذجي لتجمعات التوابع الصغيرة هو من 14 – 100 من النيوكليوتيدات. في حين ذكرت دراسات أخرى بأنها تتكوّن من 20 – 70 زوج نيوكليوتيدي طولاً. تنتشر عناقيد كهذه بكثرة في جينوم الإنسان. وإن عدد المتكررات في كل موقع جيني (Locus) يتراوح من 2 إلى أكثر من 100، إذ تُسمّى هذه المواقع الجينية VNTRs (Variable number of tandem repeats). وبما أن التغاير الوراثي يُقاس بعدد التكرارات الموجودة في المنطقة المتباينة من فرد لآخر، لذلك سُميّت بالتغاير العددي للتكرارات المترادفة أو VNTRs. إن عدد المتكررات للموقع الجيني يتغاير، وكل تغاير

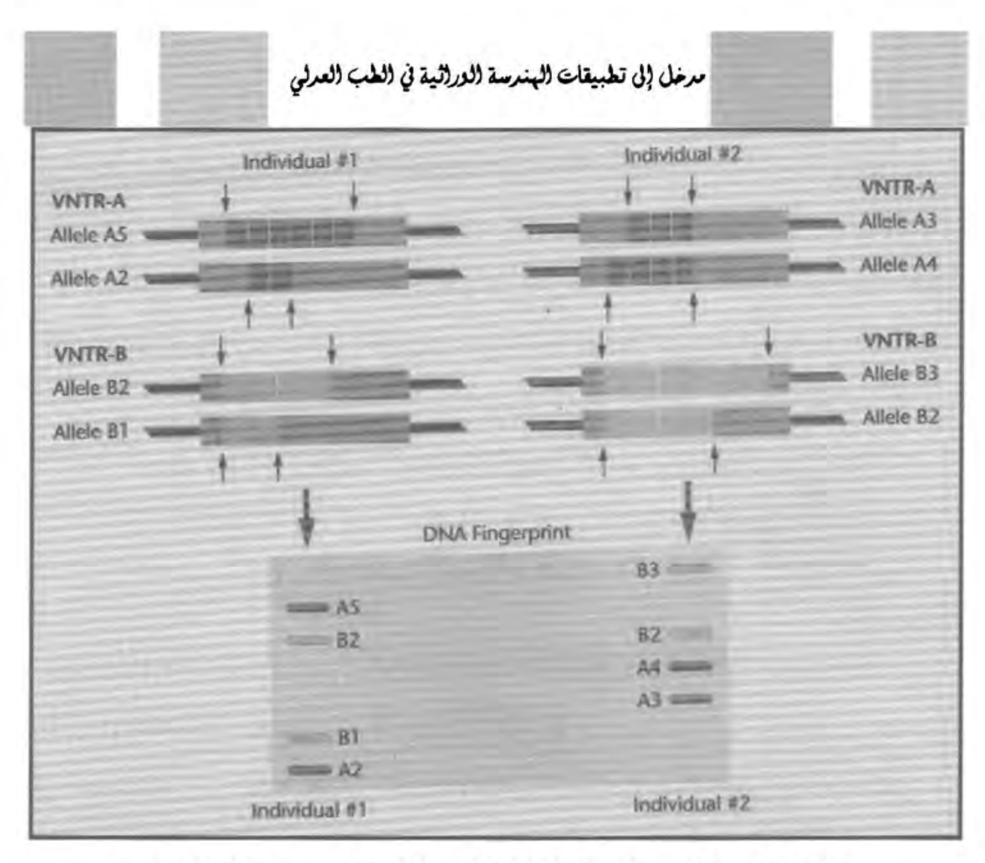
هو VNTR أليلي. مع العلم بأن عدد كبير من المواقع الجينية (Loci) يتمثّل بدرازن من الأليلات مما ينتج عن ذلك شيوع التباين الزايجوتي (Heterozygosity).

يمكن تحديد الـVNTRs باستعمال أسلوب مُشابه للـRFLPs، فبعد تقطيع الـDNA بإنزيم قاطع، تُرحّل القطع وتُمسخ (Denaturation) وتُطبّق وصمة سوذرن. إن الاختلاف الرئيسي عن الـRFLPs يكمن باستعمال مجسات خاصة للتهجين الجزيئي تتهجّن فقط مع مناطق التوابع الكروموسومية الصغيرة. وفي الوقت الذي تعكس فيه الـRSPs تنوعات بسبب وجود أو غياب موقع قطع إنزيمي فإن الـVNTRs تعكس تنوعات بسبب الأعداد المختلفة للمتكررات الواقعة بين موقعين للقطع (شكل 7 – 3). إن عدد هذه المتكررات يمكن أن يتباين بشكل واضح في المجاميع السكانية، فقد تمتلك مناطق التوابع الكروموسومية الصغيرة أعداد قليلة من هذه المتكررات (اثنتين أو ثلاث) أو عدد كبير يصل إلى العشرين أو أكثر. لذلك يعكس هذا التباين درجة عالية من التغاير الوراثي (Genetic variation) في الإنسان. لذلك فهي تختلف كثيراً من شخص لآخر (شكل 7 – 4). ومن الجدير بالذكر بأن هذا الموضوع يُشكّل أهمية خاصة أيضاً في رسم الخرائط الجينية المستعملة في تحليل الارتباط (Linkage analysis).



شكل (7 – 3). تنوّع الـVNTR

إن الاختلاف في أطوال الحزم A و B (الشكل اليمين) ينتج عن الأعداد المختلفة للمتكررات المترادفة في DNA كروموسومين مختلفين. تُشير الأسهم إلى مواقع القطع الإنزيمي على جوانب المناطق المتكررة، كما يُلاحظ المجس القابل للتهجين مع الـDNA لإظهار القطع المتباينة في الطول (الشكل الأيسر).

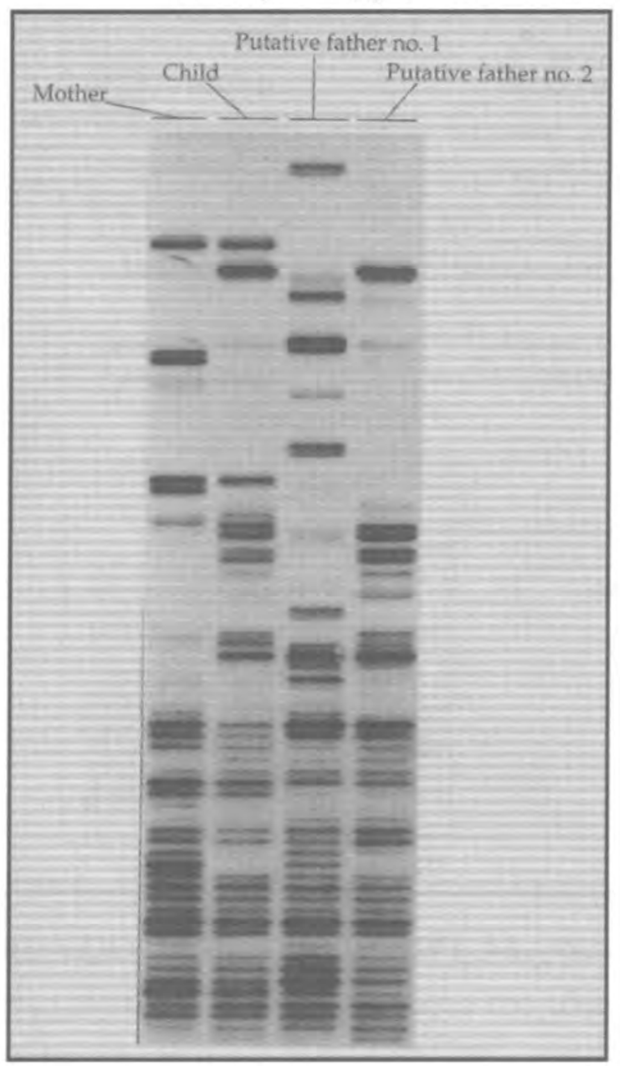


شكل (7 – 4). مواقع الـVNTR وعلاقة ذلك ببصمة الـDNA

تُلاحظ أليلات الـVNTR في موقعين كروموسوميين (A و B) لشخصين. تُشير الأسهم إلى مواقع القطع الإنزيمي على جوانب الـVNTRs (في الشكل الأعلى). ينتج عن ذلك سلسلة من القطع التي يمكن تحديدها على هيأة حزم عند تطبيق وصمة سوذرن (في الشكل الأسفل). بسبب اختلاف عدد المتكررات لكل موقع جيني فإن النمط الكلي للحزم يختلف في الشخصين رغم وجود حزمة مشتركة (الحزمة الممثلة للأليل B2).

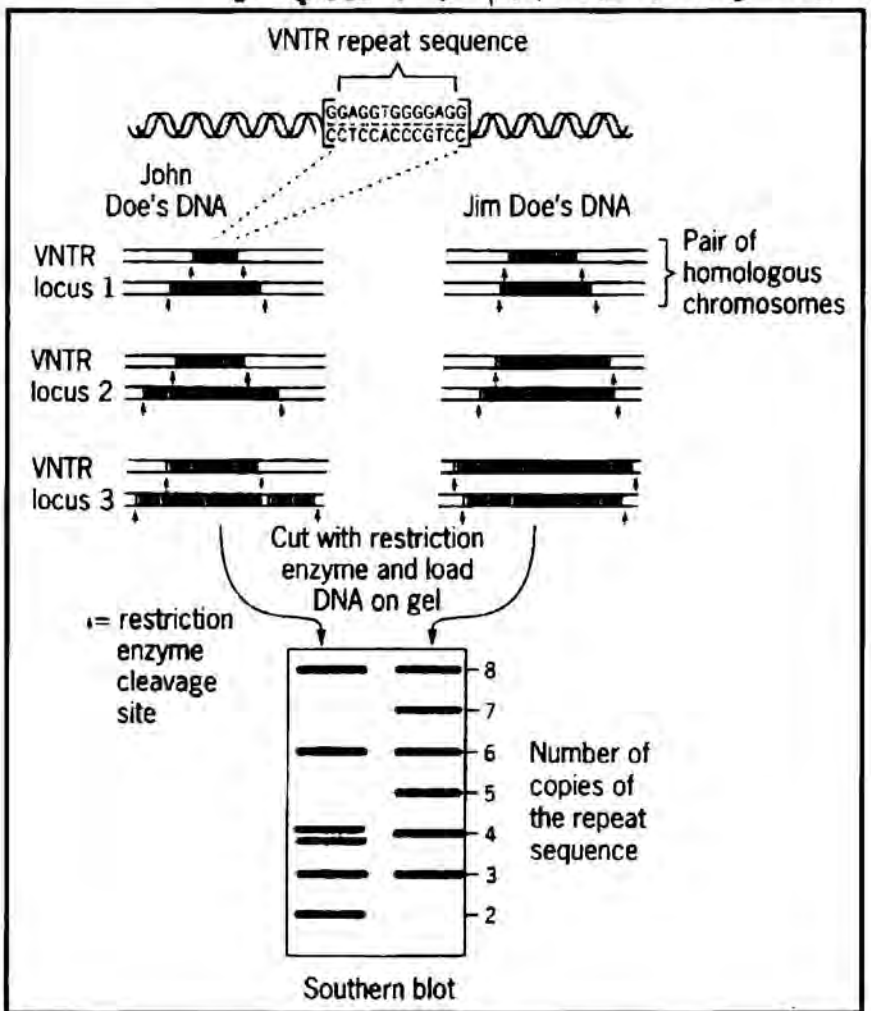
إن هذا النوع من التغايرات مكّن الباحثين من إنجاز بصمة الـDNA على عينات صغيرة (أقل من 60 مايكروليتر من الدم)، ويمكن تطبيق ذلك على عينات قديمة جداً كما هو الحال للمومياء المصرية التي تجاوزت أعمارها 2400 سنة، الأمر الذي زاد من أهميتها التطبيقية وعلى مستويات مختلفة. ولكن هذه التقنيات سواء كانت RFLPs أو VNTRs، تتطلّب تضخيم كمية الـDNA بالـPCR في كثير من الأحيان.

لقد استعمل هذا النوع من البصمات في مشاكل شرعية عديدة مثل إثبات الأبوّة Paternity testing (شكل 7 – 5)، وإثبات الأخوّة (شكل 7 – 6)، وتحديد المجرم المُشتبه به Criminal suspect (الشكلين 7 – 7 و 7 – 8).

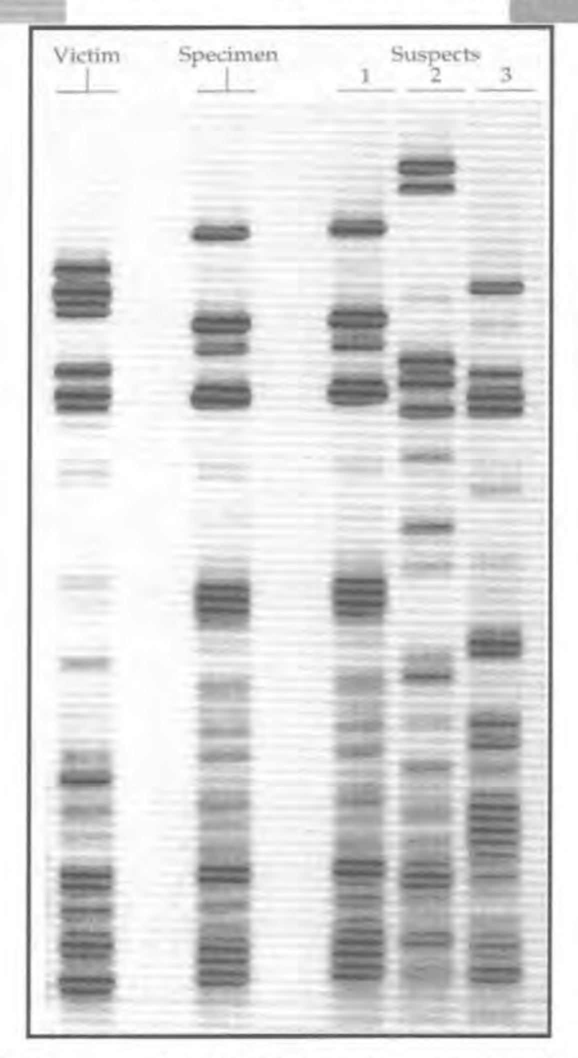


شكل (7 – 5). بصمة الـDNA لكل من الأم (المجال الأول من اليسار) وطفلها (المجال الثاني) ورجلين (رقم 1 و 2 في المجالين الثالث والرابع على التوالي) كلٌّ منهما يدّعي بأنه أباً للطفل.

ويلاحظ من خلال البصمة بأن الأب رقم 2 هو الأب البيولوجي للطفل.



شكل (7 – 6). تخطيط مبسّط لاستعمال الـVNTRs في تحضير بصمة الـDNA



شكل (7 – 7). استعمال الـVNTRs في إجراء بصمة DNA

البصمة مُحضّرة من DNA معزول من بقعة دم في موقع الجريمة (عينة الدليل – المجال الثاني)، ومن دم تم الحصول عليه من ثلاثة أشخاص مُشتبه بهم بارتكاب الجريمة مرقمين بالأرقام 1، 2، 3 (ويحتلون المجالات: الثالث والرابع والخامس على التوالي)، فضلاً عن بصمة DNA الضحية التي تحتل المجال الأول من اليسار. يظهر من النتيجة تطابق البصمة للمُشتبه رقم 1 مع بصمة بقعة الدم المتواجدة في مسرح الجريمة، وهذا يدل على كونه بالفعل هو المُرجّح بكونه الجاني. في حين تختلف بصمة المشتبه بهم رقم 2 و 3 عن بصمة بقعة الدم.

4ug 8ug
λ 1kb TS D jeans shirt V λ 1kb
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10

شكل (7 – 8). الاعتماد على الـVNTRs لتحديد بصمة الـDNA

المختبر العدلي النموذجي يُحلّل ما يقارب 13 موقع أليلي للـVNTRs المعروفة بتغايرها العالي. في هذا الشكل استعملت بصمة الـDNA في كشف حالة جرمية فيها المدّعى عليه كان متّهم بقتل فتاة طعناً بالسكين. لقد تم مقارنة البصمة الوراثية لبقع الدم الموجودة على البنطلون والقميص للمتهم مع بصمة الـDNA لعينات دم مأخوذة من المتهم والضحية، إذ لوحظ بأن الـDNA من بقع الدم لملابس المتهم لا تُطابق DNA الدم المأخوذ منه، ولكنها تطابقت مع DNA الضحية. المجالات أعلاه تحتوي DNA من المصادر أدناه: 1، 2، 3، 9، 10: هي عينات DNA سيطرة وتفيد كدلائل حجمية، 4: دم المتهم، 5: بقعة دم من بنطلون المتهم، 6، 7: بقع دم من قميص المتهم، 8: دم الضحية. أثبتت هذه البصمة تورّط المتهم في قتل الفتاة.

2. البصمة المعتمدة على التوابع الكروموسومية الدقيقة:

تتشابه التوابع الكروموسومية الدقيقة STRs (Microsatellite) مع التوابع الكروموسومية الصغيرة VNTRs (Minisatellite) بحيث يمكن أن تتباين بالطول نتيجة لوجود اختلاف في عدد المتكررات، ولكن طول المتكررات في التوابع الدقيقة يكون أصغر مقارنةً بالتوابع الصغيرة، فهي تتكوّن من 2، 3 أو 4 زوج قاعدي طولاً، ويُشار إلى ذلك بالنيوكليوتيدات الثنائية (Dinucleotides) أو الثلاثية (Trinucleotides) أو الرباعية (Tetranucleotides) على التوالي. فإذا كانت رباعية مثلاً متكررة مرتين: CTGA CTGA، أو متكررة ثلاث مرات: CTGA CTGA CTGA، أو متكررة أربع مرات CTGA CTGA CTGA CTGA وهكذا.

يمكن حدوث تكرار للتوابع الدقيقة بشكل مترادف لعدد من مئات المرات، وهذا العدد يتباين بشكل واضح بين الأفراد، وفي العادة بين الكروموسومين المتناظرين (Homologous chromosomes) للفرد الواحد.

تكمن الاختلافات بين تنوعات تكرار التوابع الكروموسومية الدقيقة (Microsatellite repeat polymorphisms) والـVNTRs في أمرين:

أ. في اختلاف الحجم، كما أُشير إليه أعلاه.

ب. لا يمكن التعرّف على التباين في التوابع الكروموسومية الدقيقة بالتقطيع الإنزيمي المستعمل في تقنية بصمات الـVNTRs، وإنما تستعمل تقنية الـPCR لعزلها والتعرّف عليها، في حين تحتوي الـVNTRs على مواقع قطع إنزيمية تقع على جوانبها (خواصرها).

تحتل تنوعات تكرار التوابع الكروموسومية الدقيقة أيضاً أهمية استثنائية في رسم الخرائط الجينية، فهي تتوفّر أكثر من الـVNTRs وأكثر انتشاراً في الجينوم، وأسهل اختباراً في المختبر. لذلك أصبحت الخيار المفضّل في دراسة أغلب الخرائط الجينية. ولكن كلا النوعين من هذه التنوّعات، سواء VNTRs أو تنوعات توابع كروموسومية دقيقة، مهم في التطبيقات الجنائية.

تستعمل حالياً التوابع الدقيقة بشكل روتيني شائع كمعلمات في اختبار شرعية الأبوّة، ففي المثال التالي (جدول 7 – 1)، استعمل 11 من معلمات التوابع الدقيقة لاختبار العينات من الأم وطفلها والأب المزعوم، إذ إن الموقع الجيني للتابع الدقيق مُؤشّر على يسار الجدول، والطراز الوراثي لكل فرد سُجّل بهيأة عدد المتكررات التي تحملها هي أو يحملها هو في ذلك الموقع. فعلى سبيل المثال عند الموقع D9S302، تحمل الأم 30 من المتكررات في أحد كروموسوماتها و 31 من المتكررات على الكروموسوم الآخر. الحالات التي فيها يحمل الفرد العدد نفسه من المتكررات في كلا الكروموسومين، يسجّل فقط رقم مفرد (بعض الأرقام يليها رقم بعد الفارزة مثل 20.2 تتضمّن تكرر جزئي فضلاً عن بعض المتكررات الكاملة).

جدول (7 – 1). معلمات التوابع الدقيقة الشائعة الاستعمال في إثبات شرعية الأبوّة

Microsatellite locus			*Alleged*	*Microsatellite locus*			*Alleged*
Chromosome location	***Mother***	***Child***	***Father***	***Chromosome location***	***Mother***	***Child***	***Father***
D9S302	30	31	32	D5S1719	11	10.3	10
9q31-q33	31	32	33	5pter-5qter	11.3	11	10.3
D22S883	17	20.2	20.2	CSF1PO	11	11	10
22pter-22qter	22	22		5q33.3.q34		12	12
D18S535	12	13	11	FESFPS	11	12	10
18q12.2-q12.3	14	14	13	15q25-15qter	12	13	13
D7SI 804	27	26	26	TH01	7	7	7
7pter-7qter	30	30	27	11p15.5			8
S3S2387	23	24	20.2	LIPOL	10	9	9
3p24.2.3pter	25.2	25.2	24				
D4S2386	12	12	12				
4pter-qter			16				

المجسات المستعملة في العلوم الجنائية:

يُعرّف المجس بأنه عبارة عن قطعة صغيرة من الـDNA لها القابلية على التهجين الجزيئي (التزاوج القاعدي) مع جزء نظير من الـDNA المستهدف (المطلوب الكشف عنه)، إذ يتم تعليم المجس إما بنظير مشع مثل نظير الفسفور (P^{32})أو بمواد لونية غير مشعّة مثل البايوتين أو الديوكسيجنين.

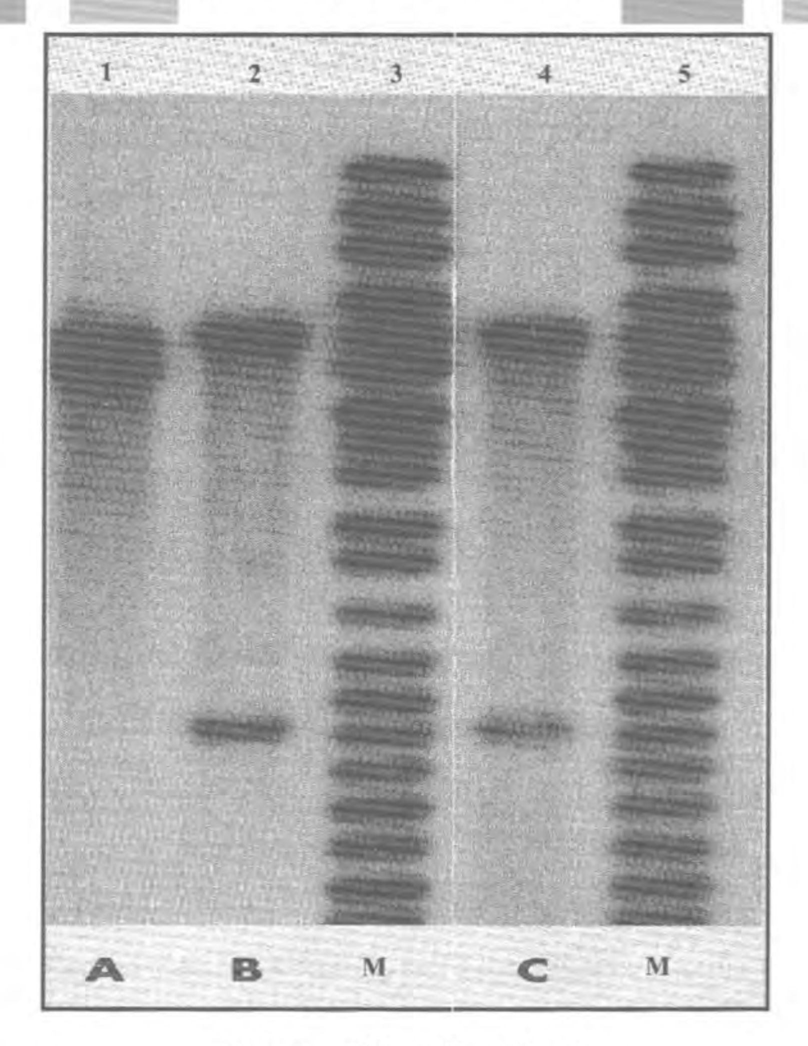
في العادة يكون تسلسل المجس المستعمل معروف، وعند ارتباطه مع تسلسل محدّد من الـDNA المُستهدف سيُكوّن مع هذه المناطق حلزون مزدوج من الـDNA مُعلّم من السهولة الاستدلال عليه. هذا وتعتمد قوة الارتباط على درجة التكامل بين شريطي حلزون الـDNA المتكوّن، فكلما قلّت درجة التكامل ضعفت القوى الرابطة (عدد الأواصر الهيدروجينية بين النيوكليوتيدات المتقابلة) والعكس صحيح.

هنالك نوعان من المجسات المستعملة في إجراء البصمة الجينية وهما:

1. المجسات أحادية الموقع (Single-locus probes):

تستطيع هذه المجسات تمييز DNA يوجد في موقع واحد فقط من الكروموسوم البشري، إذ تعتمد على موقع جيني واحد يوجد على الكروموسومين المتناظرين، ويحدّد صفة فردية للشخص وُرثت من الأب والأم مناصفةً بينهما.

وتُفضّل هذه المجسات الكاشفة في قضايا إثبات الأبوّة والأمومة وما شابهها، لأن نتائجها واضحة وسهلة ودقيقة، ولكن قد تستعمل في كشف جرائم بعض الحالات الجنائية (شكل 7 – 9).



شكل (7 – 9). نمط لبصمة DNA

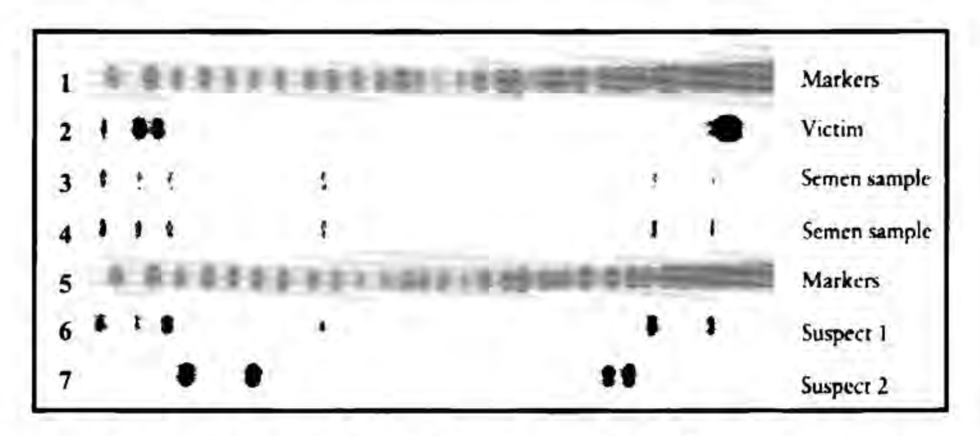
يُظهر التصوير الإشعاعي الذاتي بأن نمط حزم الـDNA للمشتبه A (المجال 1) لا يطابق نمط الـDNA المأخوذ من مسرح الجريمة C (المجال 4). في حين يتطابق نمط المشتبه B (المجال 2) مع نمط عينة مسرح الجريمة. ويستعمل دليل حجمي لقياس الحجوم الجزيئية لحزم الـDNA مؤشر بالحرف M (المجالين 3 و 5). عملياً يتم اختبار عدد معيّن من أنظمة VNTRs أو التوابع الدقيقة لتقليل إمكانية التطابق الخاطئ.

2. المجسات متعددة المواقع (Multiple-loci probes):

تستطيع هذه المجسات الارتباط مع أكثر من موقع على الكروموسوم نفسه أو على مواقع تقع على كروموسومات مختلفة، ولهذا السبب فهي تستعمل للبحث عن معظم الصفات الوراثية المُنتشرة على أزواج مختلفة من الكروموسومات المُتناظرة، ولكن النتائج المُتحصّل عليها في هذه الحالة تكون معقّدة نسبياً لكثرة عدد الحزم التي تُعطيها، ورغم ذلك تكون نتائجها دقيقة، وتُعتمد في حالات إثبات الأبوّة والأمومة (شكل 7 – 5)، وفي حالات الاغتصاب والقتل (شكل 7 – 7).

ومن أكثر المجسات متعددة المواقع استعمالاً في كل من الحالات الجنائية والمدنية هما المجسين المُشتقين من مواقع التوابع الكروموسومية للكروموسوم رقم 1 الذي يُشار إليه بالرمز 1cen-q24 والكروموسوم رقم 7 الذي يُشار له بالرمز 7q31.3. وقد كانت كافية لإدانة راندال جونز (Randall Jones) في قضية وفاة رو (Row) في فلوريدا (شكل 7 – 10)، إذ طمست سيارة جونز في الوحل، وخلال بحثه عن وسيلة لإخراج سيارته وجد عشيقين نائمين في الجزء الخلفي من سيارة نقل بيك آب واقفة في منحدر لصيد الأسماك، وقام بإطلاق النار على رأسيهما وسحب جثتيهما وأخفاهما بين الأخشاب. وبعد سحب سيارته بوساطة سيارة البيك آب عاد واعتدى جنسياً على المرأة (في مثل تلك الحالة يُعطي تشخيص الـDNA ثقة بدقّة 90 – 95٪)، وبعد استخلاص الـDNA من النطف التي أُخذت من جثة الضحية ومطابقته مع بصمة DNA جونز أثبت بأنه هو المجرم.

في هذه الجريمة تم استعمال مجس مشع مفرد، وقد أثبت تطابق بصمة DNA النطف المأخودة من جسم الضحية التي اعتدي عليها مع بصمة DNA جونز (المُشتبه رقم 1 في الشكل 7 – 10، في حين أثبت براءة المُشتبه رقم 2 لعدم التطابق). وعملياً تم استعمال 3 أو 4 مجسات مختلفة لإعطاء دليل قاطع لا يقبل الشك في إدانة المجرم.



شكل (7 – 10). فلم لأشعة X يُظهر مقارنة لأنماط ناتجة بوساطة الترحيل الكهربائي لقطع مهضومة لتسلسل DNA بسيط

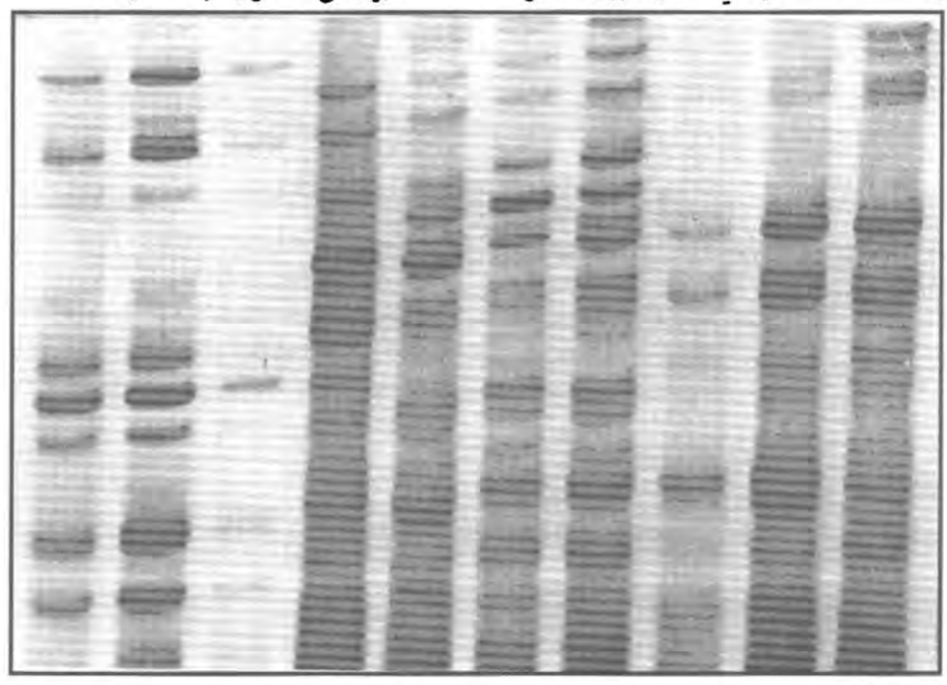
الـDNA مأخوذ من الضحية المُغتصبة (المجال 2)، ومن نطف أخذت من الضحية (المجالين 3 و 4)، ومن شخصين مُشتبه بهما (المجالين 6 و 7). المجالين (1 و 5) يمثلان دليل حجمي لقياس الحجوم الجزيئية لحزم الـDNA. تم إظهار البرهان باستعمال مجس مشع مفرد، والذي يقترح بقوة بأن المشتبه به رقم 1 (المجال 6) هو المُغتصب. عملياً تستعمل 3 أو 4 مجسات مختلفة لإعطاء تشخيص دقيق.

هذا ولم يقتصر استعمال المجسات متعددة المواقع في المجال الجنائي فقط، بل تعدّاه في كشف التلوث العرضي بالخلايا البشرية والحيوانية الحاصل في المزارع الخلوية أو النسيجية، إذ تمّ تطوير مدى من المجسات المعتمدة على التسلسلات المتكررة (Repetitive sequences) الموجودة في المملكة الحيوانية. فعند إجراء البصمة الوراثية نُلاحظ بأن كل خط خلوي (Cell line) يمتلك بصمة DNA متفرّدة ، إذ يقطع DNA الجينوم باستعمال الإنزيم القاطع *Hin*fI، ومن ثمّ تُطبّق وصمة سوذرن التي تتضمّن هنا التهجين مع مجسي جيفري 33.15 و 33.6 (يجهزان من شركة (*) Cellmark Diagnostics) (شكل 7 – 11). ويمكن أن تُباع هذه المجسات مع أنظمة كشف غير

(*) عنوان الشركة :

Cellmark Diagnostic, Blacklands Way, Abingdon Business Park, Abingdon, Oxfordshire OX14 1DY, UK. Tel.: 01235 528609, Fax: 01235 528141.

إشعاعية. كما يجري الآن تطوير أنظمة معتمدة على الكومبيوتر لتحليل بصمة الـDNA، وهذه الأنظمة تُفيد في المقارنة بين المعلومات لعدد كبير من الصور الإشعاعية.



شكل (7 – 11). أنماط بصمة DNA نموذجية لخطوط خلوية تُلاحظ عند استعمال مجس جيفري 33.15

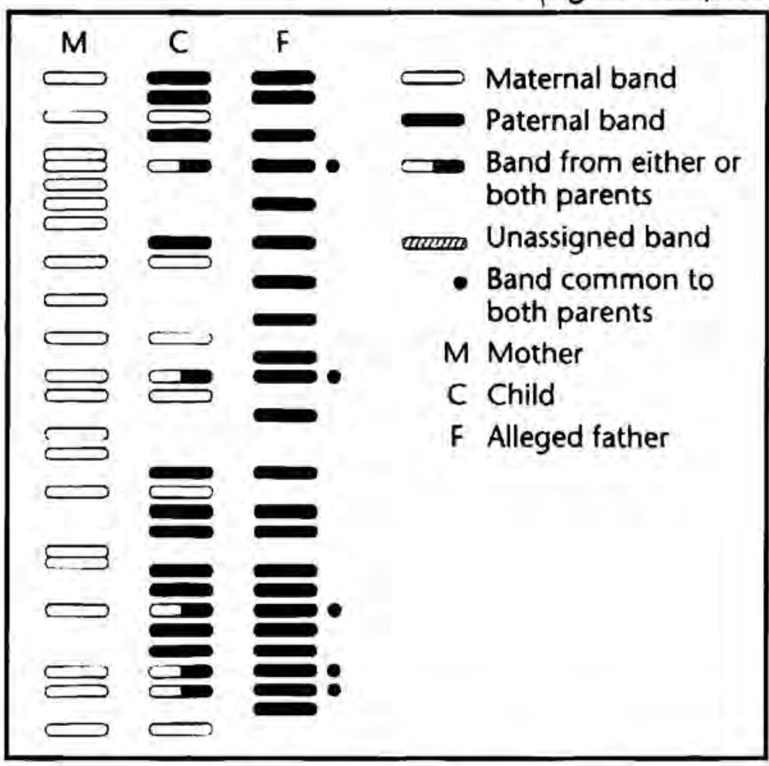
ولتقريب الصورة للقارئ نضرب المثالين التاليين، على افتراض استعمال المجسين متعددي المواقع، واللذان يتم استعمالهما بشكل شائع في كل من الحالات الاجتماعية والجنائية، والمُشتقّان من مواقع التوابع الكروموسومية (Minisatellite loci) على الكروموسوم رقم 1 (وهو $1\ cen - q^{24}$)، والكروموسوم رقم 7 ($7q^{31.3}$).

إن هذين المجسان استعملا بشكلٍ كبير، لأنهما يُعطيان بصمة DNA متفرّدة، وقد نجحا في تحديد شرعية الأبوّة في آلاف الحالات خلال السنوات الأخيرة.



أ. المثال الأول:

أدناه نتيجة بصمة الـDNA للأم (M) والأب المشكوك فيه (F) والطفل (C) بعد استعمال المجسين أعلاه (شكل 7 – 12). فهل هذه النتيجة تدل على أن الأب المشكوك فيه هو فعلاً أب لهذا الطفل أم لا ؟

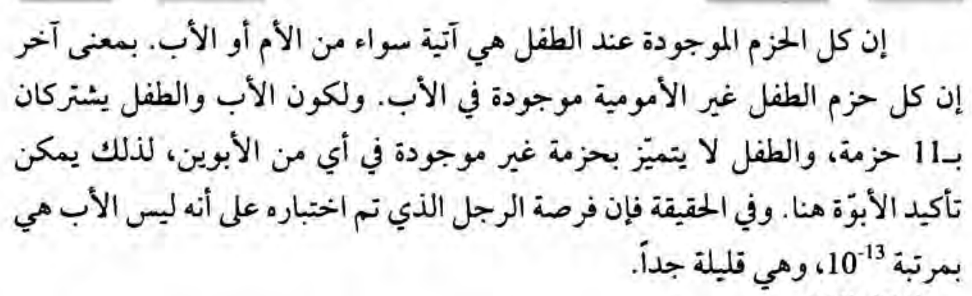


شكل (7 – 12)

بصمة DNA لاختبار شرعية الأبوّة

الحزم الفاتحة (حزم الأم). الحزم الداكنة (حزم الأب). الحزم ذات النصف الفاتح والنصف الداكن (مشتركة بين الأبوين). الدوائر الداكنة (تشير إلى الحزم المشتركة بين الأبوين).

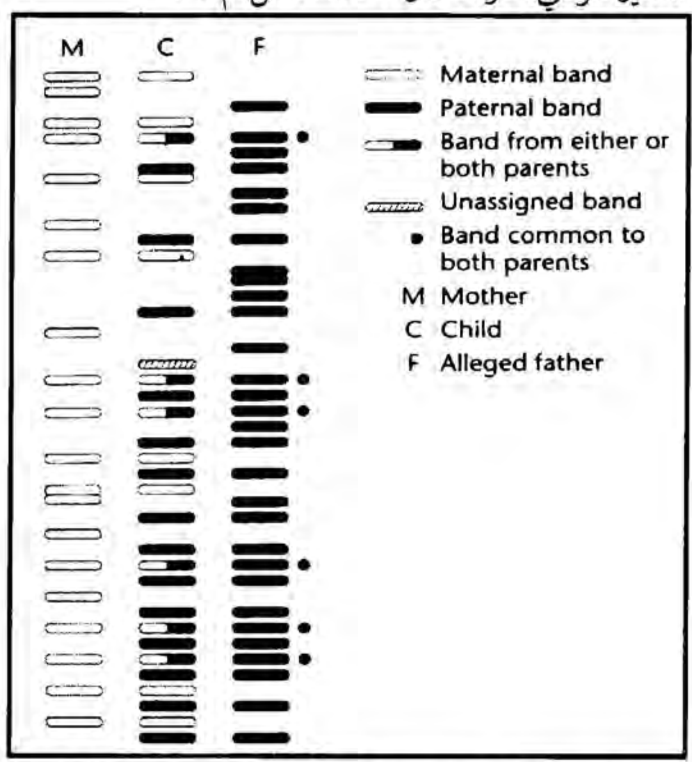
وكما مبين في الشكل، فإن الطفل يمتلك حزم 6 أمومية (Maternal bands) و 11 حزمة أبوية (Paternal bands) و 5 حزم مشتركة بين الأم والأب غير الشرعي (Alleged father).



إن كل الحزم الموجودة عند الطفل هي آتية سواء من الأم أو الأب. بمعنى آخر إن كل حزم الطفل غير الأمومية موجودة في الأب. ولكون الأب والطفل يشتركان بـ11 حزمة، والطفل لا يتميّز بحزمة غير موجودة في أي من الأبوين، لذلك يمكن تأكيد الأبوّة هنا. وفي الحقيقة فإن فرصة الرجل الذي تم اختباره على أنه ليس الأب هي بمرتبة 10^{-13}، وهي قليلة جداً.

ب- المثال الثاني:

أدناه بصمة DNA للأم (M)، والأب غير الشرعي (F)، والطفل (C). بعد استعمال المجسين سالفي الذكر (شكل 7 – 13). فهل هذه النتيجة تدل على أن الأب المشكوك فيه (الغير شرعي) هو فعلاً والد هذا الطفل أم لا ؟



شكل (7 – 13). بصمة DNA لاختبار شرعية الأبوّة

الحزم الفاتحة (حزم الأم). الحزم الداكنة (حزم الأب). الحزم ذات النصف الفاتح والنصف الداكن (مشتركة بين الأبوين). الحزمة المخططة (حزمة غير مؤشّرة لا في الأب ولا في الأم، أي يتفرّد بها الطفل فقط). الدوائر الداكنة (تُشير إلى الحزم المشتركة بين الأبوين).

في هذه الحالة يمتلك الطفل 8 حزم أمومية، و 15 حزمة أبوية، وحزمة واحدة غير موجودة في كل من الأبوين. وبسبب وجود هذه الحزمة التي يتفرّد بها الطفل، فإن أمامنا احتمالين: الأول، هو أن ظهور هذه الحزمة كان بسبب طفرة وراثية. والثاني، بأن الرجل الذي تم فحصه هو ليس أباً لهذا الطفل. وضمن تقديرات الاحتمالية للأبوّة فإنه يمكن تحديد عدد متوسط الحزم الظاهرة (n) وكذلك احتمالية معدل (x) كون الحزمة في فرد A تطابق حزمة في فرد ثاني B غير ذي علاقة. وفي تلك الحالة لكون الطفل والأب يشتركان في 15 حزمة، فإن احتمالية كون الرجل الذي تم فحصه بأنه ليس الأب تكون قليلة جداً (الاحتمالية = 10^{-7} أو أقل). وعليه فإن الاستنتاج الأكثر قبولاً بأن ظهور الحزمة المتفرّدة في الطفل هو ناتج عن طفرة. وفي الحقيقة فإنه في كل 1419 حالة لفحص الأبوّة بوساطة مجسات التوابع (Minisatellite probes) الواقعة على الكروموسومين 1 و 7، يُلاحظ حزم طافرة مفردة (Single-mutant bands) في الأطفال بحدود 399 حالة، والتي تُشكّل 28٪ من كل الحالات.

الفصل الثامن

مصادر الـDNA وإجراء البصمة الجينية





الفصل الثامن

مصادر الـDNA وإجراء البصمة الجينية

اكتشاف بصمة الـDNA:

منذ الفترة التي واكبت عصر الثورة العلمية والمحاولات البشرية مستمرّة للوصول إلى أدلّة حيوية ومفيدة في تحديد أو تشخيص علامات مُعيّنة يتفرّد بها أشخاص أو شخص مُعيّن (وحتى الحيوانات) دون الغير، للاستفادة منها في مجالات تطبيقية، طبية أو جنائية أو غيرها. فقد كان مثلاً لاكتشاف الخطوط الجلدية (Dermal ridges) في عام 1882 من قبل السير فرانسيس غالتون (Sir Francis Galton) (شكل 8 – 1)، الأثر البالغ في تعزيز الأدلة الجنائية المُعتمدة على بصمات الأصابع المتروكة على الأسطح الملساء لمسرح الجريمة. ومنذ ذلك الحين، حاول الكثير من الباحثين التوصّل إلى علامات مهمّة أخرى للتمييز بين الأشخاص، تمثّلت بالاعتماد على فصائل الدم لنظام الدم ABO وبروتينات المصل والنظائر الإنزيمية (-Iso enzymes) لكريات الدم الحمراء بعد ترحيلها كهربائياً (شكل 8 – 2). وطبقاً لذلك يُمكن استثناء نسبة لا بأس بها من المُشتبه بهم، وذلك لأن بعض الاختلافات الفردية قد لا تُكتشف على مستوى الأدلة أعلاه، الأمر الذي يترك مجالاً للشك في حقيقة العينة تحت الدراسة، والتي قد تكون لشخص آخر.



شكل (8 – 1). فرانسيس غالتون (1822 – 1911) مؤسس دراسة علم الخطوط الجلدية

Species	Lactic dehydrogenase (LDH)	Glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH)	Nucleoside phosphorylase (NP)
Human			
African Green Monkey			
Chinese Hamster			
Mouse			
Rat			
Syrian Hamster			

شكل (8 – 2). مخطط لهلام النشا العمودي (Vertical starch gel) يوضّح الأنماط التي يمكن الحصول عليها للنظائر الإنزيمية لثلاثة إنزيمات وهي LDH ، G6PDH ، NP من كائنات حيوانية مختلفة

لقد قُدّر بأن البشر يتباينون بما يُقارب $\frac{1}{300} - \frac{1}{500}$ زوج قاعدي، لذلك فإنه بحدود 10 مليون تباين قد يتواجد بين 3 بليون زوج قاعدي مُكوّن لجينوم الإنسان. وعليه فإن هنالك فقط 100 أو ما يُقارب ذلك من التباينات في مجاميع الدم وفي نمط الترحيل الكهربائي للبروتينات، وعند الاعتماد على تلك التباينات يمكن فقط تحديد نسبة بسيطة جداً من تغايرات الـDNA التابع لنا. لذلك فقد تمّ تطوير تقنيات جزيئية جديدة خلال الـ20 سنة الماضية لكي تُمكّن من تشخيص الآلاف من التنوّعات على مستوى الـDNA.

وفي عام 1985 / 1986 تمكّن العالم جيفري (Alec Jeffreys) (شكل 8 – 3) من اكتشاف بصمة الـDNA بالصدفة عندما كان يدرس مناطق التغاير المُفرط (Hypervariable regions) للجينات المسؤولة عن إنتاج الميوغلوبين (البروتين الذي يحمل الأوكسجين في الأنسجة العضلية)، إذ أصبح جيفري بعد هذا الاكتشاف، وهو لا يزال في سن الثامنة والثلاثين، زميلاً للجمعية الملكية البريطانية، ونال درجة الأستاذية من جامعة لسيستر في بريطانيا. وقد تمكّن من حل مشكلة أحد الأطفال، والذي حاولت والدته التي تحمل الجنسية الغانيّة إلحاقه بها إلى بريطانيا، ولكن السلطات البريطانية منعته بحجّة أنه ليس ابنها، إذ استطاع جيفري إثبات أمومة المرأة الغانيّة للطفل اعتماداً على بصمة الـDNA، وبالفعل أُلحق الطفل بعد ذلك بأمّه.



شكل (8 – 3). العالم جيفري مُكتشف بصمة الـDNA

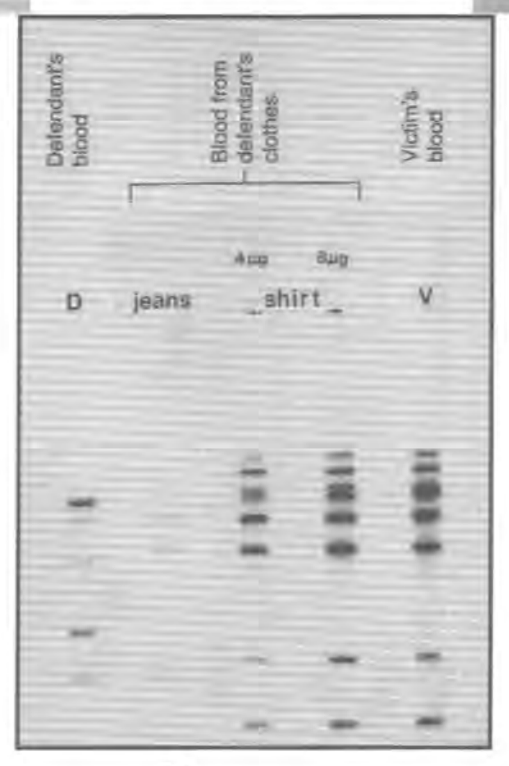
وطالما أن هذه التقنية يمكن أن تكون منافساً حقيقياً للأدلّة المُستقاة من بصمات الأصابع التقليدية، فقد أُطلق عليها بصمة الـDNA، ويُطلق عليها أحياناً نمط أو تنميط الـDNA (DNA typing).

يتطابق جميع بني البشر في جينوم الخلية الواحدة بنسبة كبيرة جداً تتجاوز 90٪، ويختلفون بنسبة قليلة، ورغم قلّة هذه النسبة، فإنها تُشكّل الجوهر الذي تعتمد عليه بصمة الـDNA. وإذا علمنا أن عدد أزواج القواعد النيتروجينية في الخلية الواحدة يقارب 3 مليار، فإن عدد الأزواج القاعدية التي تُشكّل النسبة القليلة الباقية تندرج في تسلسلات معيّنة غير فعّالة أو غير مُشفّرة.

إن اختلاف نسبة وجود التكرارات المترادفة (Tandem repeats) في هذه التسلسلات من فرد لآخر (باستثناء التوائم الصنوية) يُعدّ الأساس الذي يُعتمد عليه في التفريق من شخص لآخر بكفاءة عالية، إذ تورّث هذه الأنماط المختلفة من التسلسلات بصورة ثابتة من الآباء إلى الأبناء والأحفاد طبقاً لقوانين مندل الوراثية. مع العلم بأن هذا التنوّع يمكن أن يكون في موقع واحد من الكروموسوم أو مواقع متعدّدة ضمن الكروموسوم الواحد أو الكروموسومات الأخرى، ويُشار إلى الاختلافات في تسلسل جزء محدّد من الـDNA بين فرد وآخر بالأليلات Alleles (صور الجينات).

المصادر المهمّة للحصول على الـDNA في التطبيقات الجنائية:

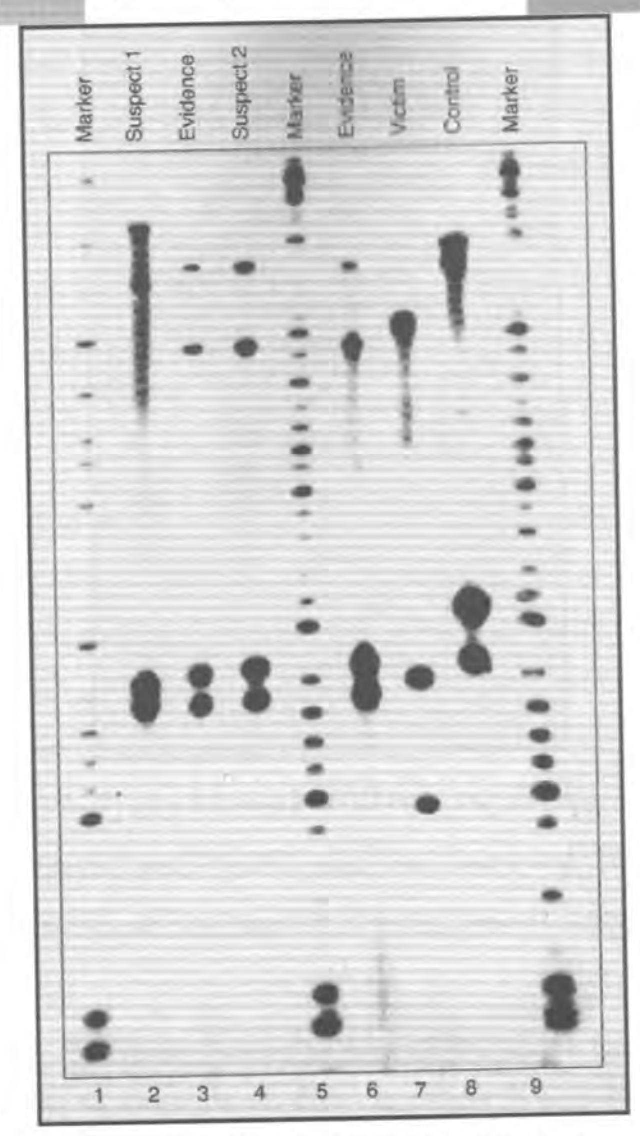
1. الدم (Blood): يُعدّ الدم من المصادر الممتازة للحصول على DNA الإنسان، إذ يتواجد الـDNA في خلايا الدم البيضاء، ولكن ليس في كريات الدم الحمراء (الفاقدة للنواة)، فحجم بسيط لبقعة دم يُقارب 50 مايكروليتر يكون كافياً لإجراء تحليل VNTR نموذجي، (شكل 8 – 4).



شكل (8 – 4). بصمة DNA مُحضَّرة من بقع الدم

بصمة الـDNA لبقعة دم وُجدت على ملابس المُتهم (بنطلون جينز وقميص) تطابقت مع بصمة DNA الضحية. وهذا يدل على أن دم الضحية قد لطّخ ملابس المجرم، مما يُرجّح كون المُتهم كان في مسرح الجريمة.

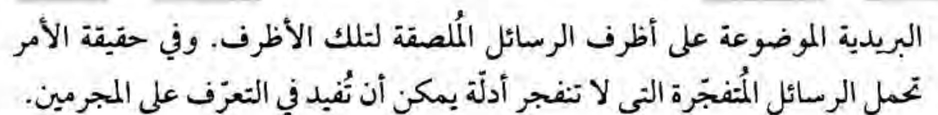
2. الحيوانات المنوية (Sperms): إن الـDNA المُستخلص من رؤوس الحيوانات المنوية (النُطف) يُعد أهم مصادر أدلة الـDNA في حالات الاعتداء الجنسي. إذ تحتوي خمسة مايكروليترات من السائل المنوي (Semen) على كمية من الـDNA بما يُقارب 50 مايكروليتر من الدم. تُستعمل طريقة استخلاص خاصة لتحرير الـDNA من رؤوس النُطف، وبناءً على ذلك فإن استخلاص الـDNA من عينات الاعتداء الجنسي يتم بطريقة مختلفة، إذ يكون ناتج الاستخلاص الأول بشكلٍ أساسي للـDNA من الخلايا الطلائية (Epithelial cells) للضحية، وناتج الاستخلاص الثاني بشكلٍ أساسي للـDNA من السائل المنوي للمُعتدي، (شكل 8 – 5).



شكل (8 – 5). بصمة DNA لحالة اغتصاب

المجال 3 دليل من مسحة مهبلية للضحية. المجال 6 لطخة سائل منوي من ملابس الضحية. بالإمكان استبعاد المُشتبه به رقم 1 لأن نمط الحُزم لا يتطابق. أما المُشتبه به رقم 2 فلا يمكن استبعاده، لأن نمط الـDNA الخاص به (المجال 4) يُطابق نمط الـDNA الموجود في عينات الدليل (المجالين 3 و 6).

3. اللُعاب (Saliva): يحتوي اللعاب على عينة خلوية لبطانة الفم، إذ يمكن استخلاص الـDNA من مكانات العض أو القضم وأعقاب السجائر ومن الطوابع



البريدية الموضوعة على أظرف الرسائل المُلصقة لتلك الأظرف. وفي حقيقة الأمر تحمل الرسائل المُتفجّرة التي لا تنفجر أدلّة يمكن أن تُفيد في التعرّف على المجرمين.

4. بُصيلات الشعر (Hair follicles): تحتوي البُصيلة الواقعة في قاعدة الشعرة على خلايا غنية بالـDNA. ولاستعمال ذلك في تحليلات الـDNA الجنائية، فإن الشعر لا بُدّ أن يكون مسحوباً من الجسم، إذ إن الشعر المُتكسّر لا يُمكن أن يكون ذو فائدة في هذا المجال، إلاّ إذا كان طول محور الشعرة لا يقل عن 1 - 2 سم للاستفادة من المايتوكوندريا القليلة الموجودة في المحور واستعمالها في دراسة تحليل تسلسل DNA المايتوكوندريا.

5. أنسجة الجسم (Body tissues): إن أي نسيج جسمي لم يزل بصورة غير مُتحلّلة يُعدّ مصدراً جيداً للـDNA.

6. العظام (Bones): تُعدّ العظام واحدة من أفضل المصادر للـDNA المُستخلص من جثث الإنسان المُتحلّلة. وحتى بعد تحلّل اللحم، فإنه يمكن في الغالب الحصول على الـDNA من العظم فاقد الأملاح. لقد استعمل الـDNA من العظام لتمييز عظام الأسرى للجنود الفيتناميين وجُثث الروس البيض لعائلة (رومانوف) الذين أُعدموا خلال الثورة البلشفية.

7. الأسنان (Teeth): كما هو الحال في العظام، فإن الأسنان يمكن أن تكون مصدراً ممتازاً للـDNA وخصوصاً بعد فترة طويلة من تحلّل الجسم.

8. البول (Urine): إن البول بحدٍّ ذاته لا يحتوي على DNA، ولكن من الممكن أن يحتوي على خلايا طلائية، والتي تحتوي على الـDNA، مع العلم أن أغلب الأشخاص الأصحّاء لا يحتوي بولهم على خلايا طلائية.

بعض الملاحظات والخطوات الأساسية حول استخلاص وحفظ الـDNA من العينات المتوفرة في مسرح الجريمة:

قبل الإشارة إلى الملاحظات والخطوات الأساسية والمهمّة عند التعامل مع العينات، لا بُدَّ من التنويه إلى معادلتين مهمّتين، الأولى تتعلّق بحساب تركيز الـDNA المُستخلص، وهي:

Concentration of DNA μgml^{-1}= Absorbance at 260 nm × dilution factor × 50

أو تُكتب بأسلوب مُبسّط:

(O.D. 260 nm) × (Dilution factor) × (50 µg/ml) = µg/ml

إذ توضع عينة الـDNA داخل أنبوبة زجاجية كوارتز خاصة في جهاز قياس الامتصاصية (مطياف U.V ضوئي)، ويُثبّت الطول الموجي عند 260 نانوميتر، وتتم ملاحظة قراءة الجهاز. إذ إن كل قيمة 1 عند هذا الطول الموجي تُكافئ 50 مايكروغرام من شريط الـDNA المزدوج لكل مل. وعليه يتم ضرب قراءة الجهاز × معامل التخفيف لعينة الـDNA × 50 (ثابت)، وعندها يكون الناتج مُقدّراً بالمايكروغرام / مل.

أما المعادلة الثانية، فتستعمل لتقدير نقاوة الـDNA المُستخلص من العينة، وهي:

$$\text{(نقاوة الـDNA) Purity of DNA} = \frac{O.D.\,260\ nm}{O.D.\,280\ nm} = or > 1.8$$

أي تُحسب امتصاصية عينة DNA عند الطول الموجي 260 نانوميتر، ثمّ تُحسب الامتصاصية للعينة نفسها عند الطول الموجي 280 نانوميتر، وبعد قسمة الامتصاصية الأولى على الثانية، يجب أن يكون الناتج ليس أقل من 1.8، فإذا كان أقل، فإن ذلك يعني أن العينة غير نقية وتحتاج إلى تنقية أو إعادة استخلاص.

هذا مع العلم بأنه توجد وسائل أخرى تستعمل في هذا المجال، وقد يستطيع الباحث المُتمرّس من ملاحظة تركيز ونقاوة الـDNA بعد ترحيل عينة منه على هُلام الأجاروز.

ورغم الأهمية التطبيقية للمعادلتين سالفتي الذكر، إلاّ أن وجود RNA مع الـDNA قد يُعطي نتائج خاطئة أو غير دقيقة، إذ من الممكن أن يتواجد الـRNA وخصوصاً إذا كانت طريقة الاستخلاص للـDNA لا تتضمّن استعمال الإنزيم الهاضم للـRNA وهو RNase. لذلك من الممكن اللجوء إلى وسائل أخرى:

أ. استعمال صبغات تُكوّن معقّد برّاق (Fluorescent complex) عند اندماجها مع الـDNA، مثل: DABA ، Hoechst 33258 ، DAP10 ، Ethidium Bromide.

ب. التهجين مع مجس معلوم الكثافة وبوجود سيطرة سالبة.

وفيما يتعلّق بالفقرة (أ) تتم الطريقة كما يأتي:

1. تحضير هُلام أجاروز بتركيز 0.5٪ .
2. تُحمّل إحدى حفر الهُلام بدليل حجمي، مثل DNA الفايروس لامدا (λ) المقطوع بإنزيم *Hin*dIII أو إنزيم قاطع آخر بحيث تكون القطع الناتجة معلومة الحجم الجزيئي. وتحمّل حفرة أخرى بـDNA قياسي معلوم التركيز وغير مُقطّع. هذا فضلاً عن حفرة أخرى توضع فيها العينة تحت الاختبار.
3. يتم إجراء الترحيل الكهربائي للعينات الثلاث لمدة 1 – 2 ساعة (الفولتية = 5 فولت).
4. يُصبغ الهُلام ببروميد الإثيديوم.
5. يُفحص الهُلام فوق جهاز الـUV transilluminator عند الطول الموجي 302 نانوميتر، ثمّ يُصوّر وتُجرى عملية المقارنة.

وبشكلٍ عام كلّما كانت حُزم الـDNA أكثر وضوحاً وذات حواف حادّة ومُميّزة، دلَّ ذلك على نقاوة جيدة.

تنقية الـDNA:

إن نقاوة الـDNA تعتمد بشكلٍ أساسي على الطريقة المستعملة في الاستخلاص وطبيعة العينة المُنتقاة، ومع ذلك فقد طوّرت طرق عديدة وحديثة للتنقية، ولكن بشكل عام يمكن الاستفادة من الخطوات الآتية:

1. يجب التخلّص من البروتينات الخلوية باستعمال إنزيم Proteinase.
2. المعاملة بالـSodium perchlorate.
3. المعاملة بالفينول.
4. إجراء الطرد المركزي للعزل.
5. المعاملة بالفينول / كلوروفورم.



6. المعاملة بالكلوروفورم.
7. إجراء الفرز الغشائي (الديلزة) بوجود دارئ TE، أو الترسيب بالإيثانول المُطلق المُبرّد.

وللحصول على DNA شديد النقاوة:

8. إجراء الطرد المركزي بوجود كلوريد السيزيوم.
9. تركيز الـDNA بإضافة PEG.

مُلاحظة: إن عينات الـDNA المحفوظة يجب أن تكون بحجم جزيئي أكبر من الحجم الجزيئي لقطع الـDNA المطلوب دراستها (وبشكلٍ عام يُفضّل أن تكون أكبر من 10 – 20 كيلو زوج قاعدي).

التعامل مع العينات الإثباتية:

أ. الدم (Blood):

1. التخلّص من كريات الدم الحمراء بوساطة تحليلها وترك الخلايا الأخرى أو أنويتها (خلايا الدم البيضاء) لاستخلاص الـDNA، مع ضرورة إزالة الحديد الناجم عن تكسّر كريات الدم الحمراء، لأنه يُسبّب تحطّم الـDNA.
2. امزج مع 4 أحجام من دارئ التحليل (Lysis buffer).
3. رسّب بالطرد المركزي، وتابع أدناه:

إذا كانت العينة بقعة دم (Blood stain) يتم ما يأتي:

اغمس الجزء الحاوي على البقعة لمدة طول الليل عند درجة 4°م في دارئ التحليل.

4. أعد الاستخلاص باستعمال دارئ لتحليل الأنوية (يحتوي على NaCl ، HCl ، DTA، pH = 7.4).
5. أضف إنزيم Proteinase K.
6. عامل بالـSDS.
7. احضن لمدة 2 ساعة عند 65°م. وتابع عمليات الاستخلاص الروتينية.





ب. السائل المنوي (Semen):

تُعدّ النُطف أكثر مقاومة للتحلّل مقارنةً ببقية الخلايا.

1. تؤخذ مسحة مهبلية وتُعامل بالمحلول الفسيولوجي (Normal saline).
2. إجراء الترسيب. وتابع أدناه:

إذا كانت العينة بقعة لسائل منوي (Semen stain)، يتم ما يأتي:

قطع الجزء الحاوي على البقعة إلى أجزاء صغيرة، ثمّ تنقع مع التحريك المستمر (عند درجة 4°م) في محلول PBS + الـSarcosyl، ثمّ يُجرى الطرد المركزي.

3. للتخلّص من التلوّث الناجم عن وجود خلايا تعود للمرأة، يجب إعادة تعليق الراسب في Proteinase K + SDS + PBS واحضن عند درجة حرارة 65°م.
4. أعد الاستخلاص (لتحليل رؤوس النطف) في مكونات النقطة (3) أعلاه نفسها + EDTA + DTT، ثمّ احضن عند درجة حرارة 65°م. وتابع عمليات الاستخلاص الروتينية.

ج. الأنسجة الرخوة (Soft tissues):

سواء كانت طرية حديثة أو مُتحلّلة (Fresh or decomposed):

1. قطّع إلى قطع أصغر بوساطة مقص نظيف.
2. ضع القطع في المحلول الفسيولوجي وجانس باستعمال مُجانس الأنسجة (Tissue homogenizer) عند درجة 4°م.
3. اجمع بوساطة الطرد المركزي. وتابع عمليات الاستخلاص الروتينية.

د. الأنسجة المجمدة (Frozen tissue):

1. كسّر بوساطة هاون.
2. أطحن بوساطة خلاّط (بوجود النيتروجين السائل).
3. ضع المسحوق في دارئ التحلل.
4. أضف SDS + Proteinase وتابع عمليات الاستخلاص الروتينية.

هـ. العظام (Bones) نخاع العظم والمادة البينية (Marrow and matrix):

بالنسبة للنخاع يتم:

1. فتح العظم ميكانيكياً.
2. يُقشط جزء من النخاع.
3. يُضاف الدارئ المُحلّل ويُباشر بطرق الاستخلاص الروتينية.

أما المادة البينية الصلبة فيتم:

1. قطّع إلى قطع صغيرة.
2. امزج باستعمال الخلاط بوجود النيتروجين السائل.
3. جانسه باستعمال المُجانس إلى مسحوق.
4. حلّل باستعمال دارئ التحليل، وتابع عمليات الاستخلاص الروتينية.

و. العينات المحفوظة بالفورمالين (Formalin samples):

وهي عينات غالباً ما يكون فيها تحاشي تحلّل الـDNA صعباً.

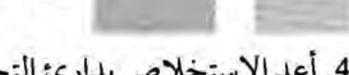
1. اغسل النسيج بالمحلول الفسيولوجي.
2. قطّع إلى قطع صغيرة.
3. جانس بمجانس في المحلول الفسيولوجي المُبرّد.
4. رسّب وأعد الاستخلاص بدارئ التحليل.
5. أضف SDS + Proteinase، وتابع عمليات الاستخلاص الروتينية.

ز. الأنسجة المطمورة بالبرافين (Paraffin-embedded tissues):

وهذه أيضاً عينات غالباً ما يكون تحاشي تحلّل الـDNA فيها صعباً.

1. أزل البرافين الزائد.
2. قطّع إلى شرائح صغيرة بوساطة شفرة حادة.
3. اغسل بالزايلين ثمّ بالإيثانول.





4. أعد الاستخلاص بدارئ التحليل.
5. أضف SDS + Proteinase، وتابع عمليات الاستخلاص الروتينية.

انواع العينات (Types of samples):

هنالك نوعين من العينات التي يمكن أن تؤخذ من الأشخاص المُشتركين في الحدث الجُرمي، هما:

1. عينات مسرح الجريمة (Crime scene):

أو عينات الإثبات أو الدليل الطبي (Medical evidence)، والتي تؤخذ من شخص، أو قد تربط هذا الشخص مع آخر أو مع مسرح الجريمة.

ومن الأمثلة على ذلك، تلك التي تتضمّن مسحات مهبلية تحتوي على سائل منوي يؤخذ من الضحية المُغتصبة، أو بقايا دم تؤخذ كمسحات من المجرم بعد وقوع الجريمة.

2. عينات مرجعية Reference samples:

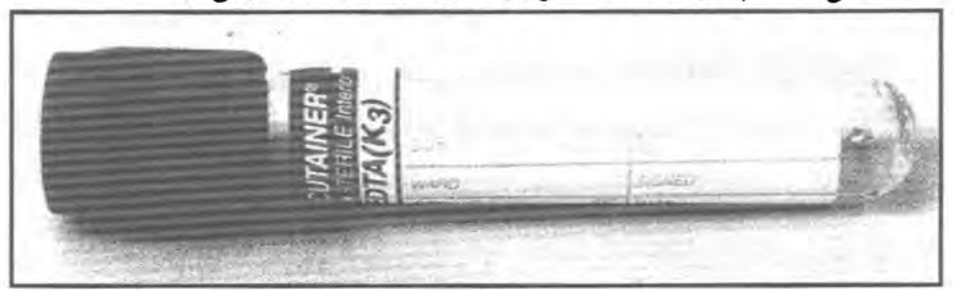
وهي تلك العينات التي يتم معها مختبرياً مقارنة العينات المأخوذة من مسرح الجريمة لتحديد المُشتبه به أو الضحية. إن أغلب العينات المرجعية الشائعة المستعملة هي مسحات من الفم أو عينات دم لإجراء تحليل الـDNA.

يجب أن تُحفظ كل من عينات الإثبات الطبية أو المرجعية دائماً مفصولة، لتقليل احتمالية التلوث الاختلاطي (Cross-contamination).

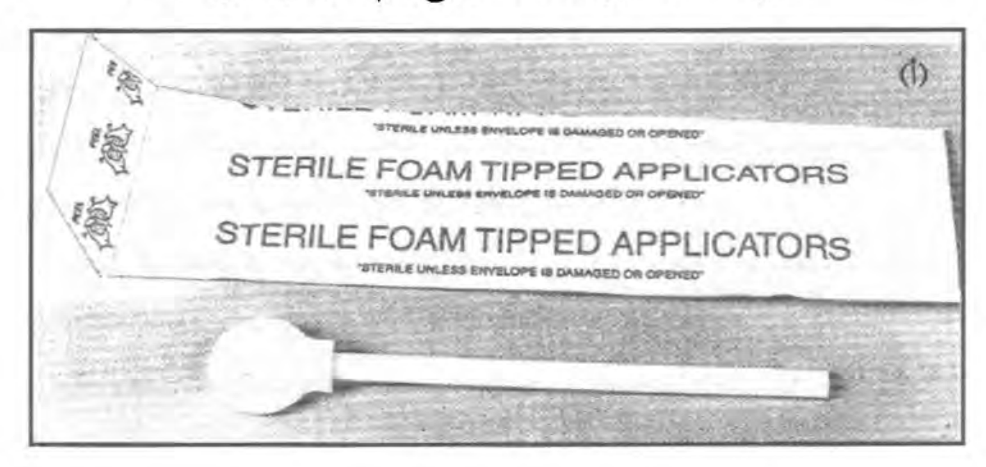
وبالنسبة للحاويات والمعدات المستعملة لجمع العينات، فإنها تتباين حسب مختبر التحليل، ولكنها في العادة تتضمّن الآتي:

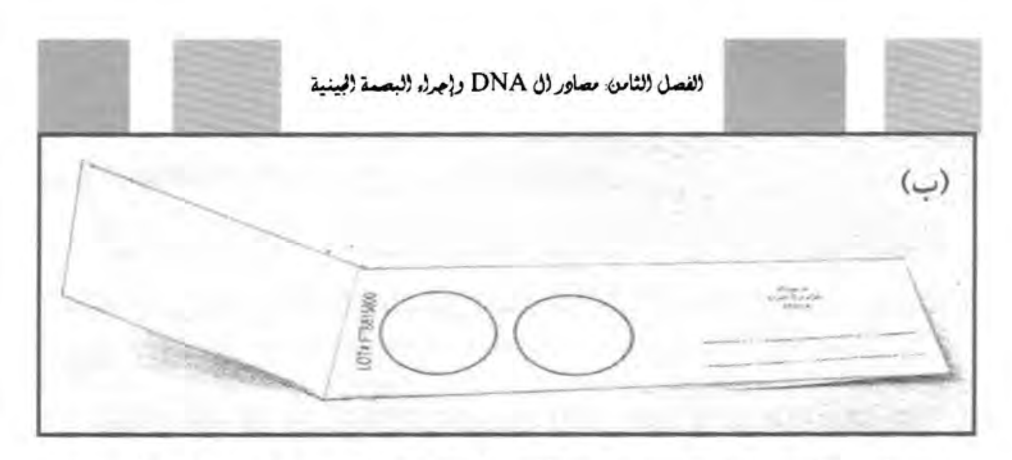
1. توضع عينات الدم في أنبوبة EDTA للـDNA المرجعي (شكل 8 – 6).
2. تستعمل مسحات الفم وورق FTA للـDNA المرجعي (شكل 8 – 7).
3. يوضع الدم غير المتخثّر (غير المتجلّط) في أنبوبة Potassium oxalate و Sodium fluoride لأغراض الكحول والعقاقير الأخرى.

4. يوضع البول في حاوية معقمة لأغراض تحليل العقاقير.
5. تستعمل مسحات الصوف القطني الجافة كمسحات دليل.
6. تستعمل المحفظات والحقائب البلاستيكية طرفية الغلق (Plastic clip seal bags) للشعر والألياف والمواد البيولوجية مثل الأوراق من الملابس والأجسام الغريبة من الجروح ... الخ.
7. تستعمل الحقائب أو المحفظات الورقية (Paper bags) للملابس الجافة.



شكل (8 – 6). أنبوبة EDTA لجمع الدم لأغراض تحليل الـDNA





شكل (8 – 7). عدّة أخذ مسحة من الفم لأغراض جمع الـDNA (أ)، وورق FTA لجمع الـDNA (ب)

هذا ولا بُدّ من تعليم (تأشير) العينة بالمعلومات الآتية:

1. اسم الشخص.
2. تاريخ ولادة الشخص.
3. اسم الطبيب.
4. تاريخ ووقت أخذ العينة.
5. منطقة العينة.

ويجب أن تُحفظ العينات في محفظات محكمة الغلق أو عُدد للنقل (شكل 8 – 8).



شكل (8 – 8). مكونات عدّة أخذ الـDNA مع المحفظات محكمة الغلق



جمع العينات:

يُبيّن الجدول (8 – 1) القيمة الإثباتية للعينات التي قد تؤخذ بعد الاعتداءات الجنسية، والتي يمكن الاعتماد عليها في اختبارات تحليل الـDNA بالنسبة للضحية أو الشخص المُشتبه به.

جدول (8 – 1). القيمة الإثباتية للعينات المأخوذة بعد الاعتداءات الجنسية

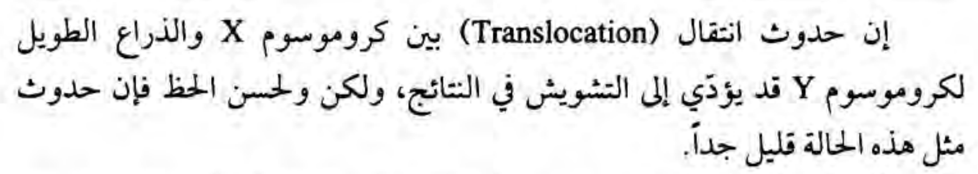
نوع العينة	العدة المستعملة	القيمة الإثباتية
العينات المأخوذة من الضحية		
مسحة من فوهة الرحم أو أعلى المهبل أو أسفل المهبل أو فرج المهبل	مسحة جافة وشريحة زجاجية	التعرف على النُطف والـDNA من سوائل الجسم التي تعود للمعتدي
مسحة من حول المخرج أو من المستقيم	مسحة جافة وشريحة زجاجية	التعرف على النُطف والـDNA من سوائل الجسم التي تعود للمعتدي
مسحة من العضّة	مسحات رطبة وجافة	خلايا من الفم لإجراء تحليل الـDNA
قطع أظفرية، قشوطات أو مسحات من الأظافر	قاطعة أظافر أو مقص أو عود خشب البرتقال أو عود تنظيف الأسنان	خلايا الدم أو الخلايا الطلائية لإجراء تحليل الـDNA من المُشتبه به، هذا إذا قامت الضحية بخربشة وتخديش المجرم
شعر العانة	مشط وصوف قطني	الشعر المُتساقط والألياف من المشتبه به
الدم والبول	حاوية الـFluoride oxalate أو حاوية جمع العينات العادية	العقاقير المستعملة لتسهيل الاعتداء الجنسي
الملابس	حقيبة ورقية	السائل المنوي، الشعر، الألياف، الدم من المُشتبه به أو مسرح الجريمة
المواد الساقطة القريبة من الضحية	غلاف ورقي نظيف	مواد بيولوجية، شعر، ألياف، قد تساعد في التعرّف على المشتبه به أو مسرح الجريمة

نوع العينة	العدة المستعملة	القيمة الإثباتية
مسحة دم أو فم	أنبوبة EDTA للدم أو مسحة أو ورق FTA	عينة مرجعية لـDNA الضحية
العينات المأخوذة من المُشتبه به		
مسحات من قاعدة ومحور القضيب الذكري	مسحة جافة	خلايا مخاطية (Mucosal cells) من المهبل أو المستقيم تعود للضحية
قطع أظفرية، قشوطات أو مسحات من الأظافر	قاطعة أظافر أو مقص أو عود خشب البرتقال أو عود تنظيف الأسنان	خلايا من المهبل أو المستقيم تعود للضحية إذا قام المجرم بإدخال أصابعه في هذه الأماكن
مسحة من العضّة	مسحات رطبة وجافة	لعاب مع خلايا من الفم من الشخص المعضوض لتحليل الـDNA، هذا فيما إذا قامت الضحية بعضّ المجرم
الدم	أنبوبة EDTA أو مسحة أو ورق FTA	عينة مرجعية لـDNA المُشتبه به
الملابس	حقيبة ورقية	دم، شعر، ألياف تعود للضحية أو مسرح الجريمة

تحديد الجنس (Sex determination):

إن وجود السلاسل المتكررة المتميّزة الواقعة على كروموسوم Y يمكن أن تساعد في معرفة الـDNA الذي يُميّز الأفراد الذكور، إذ يتم كلونة (استنسال) هذه السلاسل المتكررة واستعمالها لتحديد الجنس، والاستفادة منها للأغراض الجنائية أو الطبية.

إذ يتم تقطيع الـDNA مع إنزيم قاطع مناسب، ثمّ يُهجّن مع مجس (تتوفّر حالياً ثلاثة مجسّات في المختبرات تؤدي الغرض نفسه)، بحيث تتكوّن حزمة تهجين موجبة تدلّ على الجنس المُذكّر.



إن حدوث انتقال (Translocation) بين كروموسوم X والذراع الطويل لكروموسوم Y قد يؤدّي إلى التشويش في النتائج، ولكن ولحسن الحظ فإن حدوث مثل هذه الحالة قليل جداً.

يُحدّد الجنس أيضاً باعتماد تنميط الـAmelogenin، إذ أن أليله المحمول على كروموسوم X يكون بحدود 103 قاعدة، أما أليله المحمول على كروموسوم Y فهو بحدود 109 قاعدة. وعليه فإن العينة الذكرية تُظهر كل من قطعتي الـX و Y. في حين أن العينة الأنثوية تُظهر فقط قطعة X.

بعض الأسباب التي تؤدّي إلى تحطّم أو ظهور نتائج خاطئة للـDNA المستعمل في دراسة البصمة الجينية:

عند التداول مع العينات، لا بُدَّ من تقليل التحطّم أو التداخل الذي من الممكن أن يحدث للـDNA بسبب عدد من العوامل، منها:

1. الإنزيمات القاطعة:

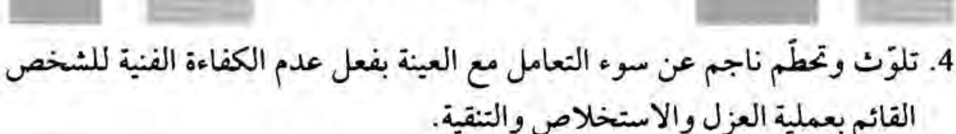
الناتجة عن التلوث الميكروبي، إذ يمكن أن يحدث هذا التحطيم بصورتين، الأولى تتمثّل بتكسّر أو هضم الـDNA من الأطراف (End degradation) والذي يحدث بفعل الإنزيمات القاطعة الخارجية (Exonucleases). والثانية تتمثّل بتقطيع الـDNA من الداخل في الشريط المزدوج للـDNA (Double strand break) بفعل الإنزيمات القاطعة الداخلية (Endonucleases).

2. تلوث بالتربة (Soil contamination):

والذي يؤدي إلى إمكانية استخلاص DNA كروموسومي أو بلازميدي تابع للبكتريا المتواجدة في التربة وليس للعينة، ومن ثمّ تداخله مع نتائج DNA العينة المطلوبة.

3. تحطم في الـDNA بفعل عوامل بيئية:

مثل أشعّة الشمس ودرجة الحرارة والرطوبة وغيرها. وبشكلٍ عام فإن قطع الـDNA الكبيرة تُعدّ هدفاً سهلاً للتحطّم مقارنةً بالقطع الصغيرة.

4. تلوّث وتحطّم ناجم عن سوء التعامل مع العينة بفعل عدم الكفاءة الفنية للشخص القائم بعملية العزل والاستخلاص والتنقية.

ملاحظة: إذا وُجدت العينة أو الدليل الجنائي على قطع السكراب والحقائب البلاستيكية والمواد الصناعية، فإنها تُعدُّ مناسبة. أما إذا وُجدت على السجّاد فإنها غير مناسبة لحدٍّ ما، وذلك لإمكانية حدوث التلوّث الميكروبي بالبكتريا.

حفظ الأدلّة الجنائية Preservation of forensic evidence:

أ. حفظ الدم:

يُحفظ الدم بالـCitrate أو الـEDTA (الهيبارين أقل استعمالاً) في أنبوبة اختبار لأيام بدرجة حرارة الغرفة، وإذا أُريد حفظه لسنوات، فإنه يُحفظ بدرجة حرارة 4°م بالتجميد، ولكن دون إذابة. أو تُجفّف العينة السائلة في الهواء على ورق ترشيح، وتوضع داخل مُغلّف بلاستك لحفظها وحمايتها من الرطوبة، وتُخزن بدرجة حرارة 4°م أو – 20°م.

ب. حفظ الأنسجة:

يُثبّت النسيج ثمّ يُغسل بالمحلول الفسيولوجي ثمّ يُحفظ مُبرّداً أو مُجمّداً.

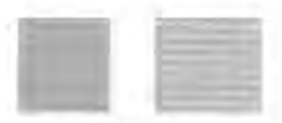
تضخيم الـDNA باستخدام تقنية الـPCR:

إن كل من تقنية RFLP و VNTR المُهمّتين في عدد من التطبيقات تعتمد بشكل أساسي على وصمة سوذرن وطريقة الكلونة، ولكن هاتين الأخيرتين تُعدّان محدودتين، إذ تحتاج الكلونة إلى وقت وتتطلّب أسبوعاً أو أكثر من الوقت المختبري، فضلاً عن ذلك تتطلّب وصمة سوذرن إلى كميات كبيرة نسبياً من الـDNA تصل بشكلٍ عام إلى ميكروغرامات (يصل حجم الدم المسحوب مباشرةً إلى 1 مل)، لذلك طوّرت تقنية جيّدة لمضاعفة نسخ الـDNA سُميّت PCR. تعتمد الـPCR على وسائل صناعية لمضاعفة تسلسل مُعيّن من الـDNA (أجزاء من الـKb أو أقل) بشكل سريع، لذلك تتكوّن ملايين النسخ من هذه السلاسل في فترة قياسية. ويمكن تلخيص هذه الطريقة (راجع الفصل السادس) بالخطوات الآتية:



1. توفّر بادئين (Two primers) كل منهما يتألّف من 15 – 20 قاعدة من الـDNA، وهذه التسلسلات القصيرة تسمّى بالنيوكليوتيدات المحدودة(Oligonucleotides) بحيث تُطابق هذه البوادئ تسلسلات الـDNA المجاورة للتسلسل المُراد إكثاره، والذي من الممكن أن يحتوي على توابع كروموسومية. إن هذه البوادئ تُصنع في مؤسسات مختبرية خاصة.
2. إنزيم بلمرة الـDNA (Taq polymerase) مستقر حرارياً مُستخلص من بكتريا Thermus aquaticus (المُتحمّلة للحرارة، والتي تعيش في الفوّارات الساخنة)، والذي يعمل على مضاعفة الـDNA، إذ تبدأ استطالة البادئ (Primer extension).
3. عدد كبير من نيوكليوتيدات الـDNA الحرة.
4. الـDNA الجينومي للفرد المطلوب. وبسبب دقّة الـPCR يمكن اعتماد كمية DNA قليلة للبدء بإكثارها (تتراوح بشكلٍ عام من 10 – 50 نانوغرام).

يُسخّن الـDNA الجينومي في بداية الأمر إلى درجة حرارة عالية نسبياً (بحدود 90 درجة مئوية)، لذلك يُمسخ ويصبح أشرطة مفردة، ثمّ يُعرّض لكميات كبيرة من البوادئ التي تتهجّن معه (تتزاوج قاعدياً) مع القواعد المُكمّلة في الـDNA الجينومي، ثمّ يُبرّد للسماح لعملية التهجين (بحدود 35 – 65 درجة مئوية)، ويُسخّن الـDNA بعد ذلك إلى درجة حرارة وسطية (بحدود 70 – 75 درجة مئوية)، وبوجود عدد كبير من القواعد الحرة، إذ يتم تصنيع شريط جديد من الـDNA بفعل الإنزيم، ويستمر بإضافة القواعد ابتداءً من البوادئ. إن الشريط الجديد المُصنّع يتكوّن من مزدوج يمتلك نهاية '5 للبادئ عند إحدى النهايات، يعقب ذلك القواعد المُضافة خلال استطالة البادئ بوساطة الإنزيم. يتم تسخين الأشرطة المزدوجة مرةً أخرى لدرجة حرارة عالية لمسخ الأشرطة، ثمّ تُكرّر دورة التسخين والتبريد مرّةً أخرى، إذ يعمل الـDNA المُصنّع حديثاً كقالب لصناعة DNA لاحق، وكلّما استمرّت دورة الحرارة – برودة تتضاعف جزيئات الـDNA بشكل هندسي بحيث يتضاعف عدد النسخ في كل دورة بمتوالية 2 ، 4 ، 8 ، 16 وهكذا، لذلك تُسمّى هذه الطريقة تفاعل السلسلة (Chain reaction). تُكرّر الدورات بشكل نموذجي (20 – 30 مرة) لإنتاج ملايين النسخ من الـDNA

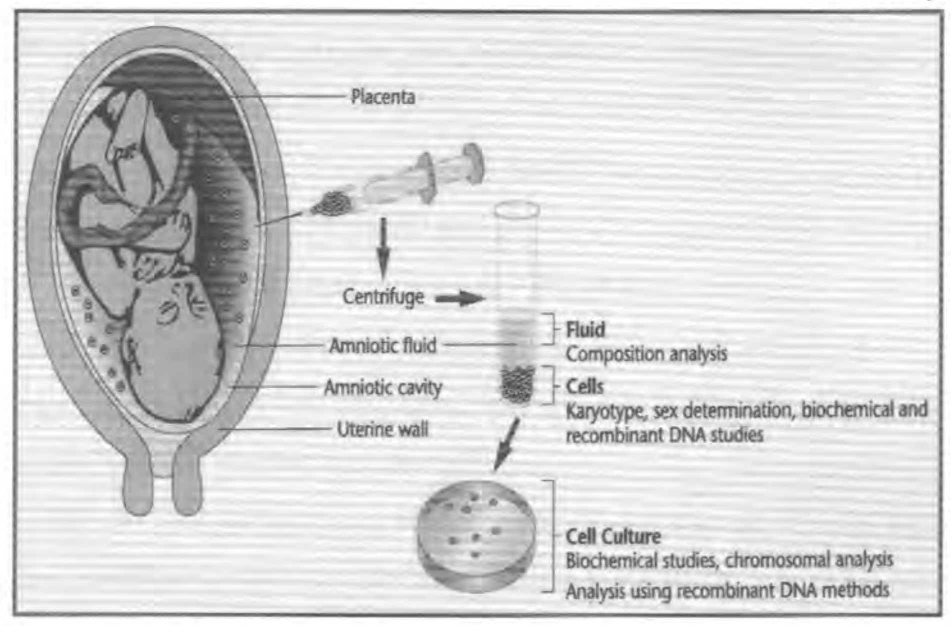


الأصلي. تحتاج هذه التقنية إلى وقت قصير، لذلك فإن جزيئة مفردة من الـDNA يمكن تضخيمها لصناعة ملايين النسخ خلال بعض الساعات، وبعد تضخيم الـDNA يمكن تحليله ودراسته بطرق مختلفة. تتفوّق هذه الطريقة على غيرها من الطرق القديمة من خلال:

1. يمكن أن تستعمل مع كميات قليلة من الـDNA (نانوغرام وحتى بيكوغرام مقارنةً بما تحتاجه الكلونة إلى ميكروغرامات) حتى ولو كانت مستخلصة من بقعة دم قديمة مضى عليها سنين، أو شعرة مفردة، أو لعقة لعاب على ظهر طابع بريدي تكون كافية للتحليل.
2. لا تتطلّب كلونة جينية، لذلك تكون سريعة، فمثلاً التشخيص الوراثي لمرض خلايا الدم المنجلية (Sickle cell disease) يتطلّب أسبوعاً أو أكثر في التقنيات القديمة، في حين يمكن إنجازه في يوم واحد باستعمال تقنية الـPCR.
3. بما أن الـPCR تُنتج كميات كبيرة من الـDNA النقي جداً، فإنها لا تحتاج إلى مجسّات مُعلّمة إشعاعياً للكشف عن DNA مُعيّن أو طفرة معيّنة، لذلك يمكن الاستعاضة بمجسّات غير مُشعّة مُعلّمة بالبايوتين مثلاً.
4. تستغرق تلك العملية يوم واحد ونصف اليوم تقريباً من البدء وحتى الحصول على الصورة الإشعاعية الذاتية، إذ إن القطع المُضخّمة يمكن أن يتم تعليمها ودراسة التسلسل النيوكليوتيدي لها (باستعمال هُلام الأكريل أمايد المُعد لدراسة تسلسل الـDNA).

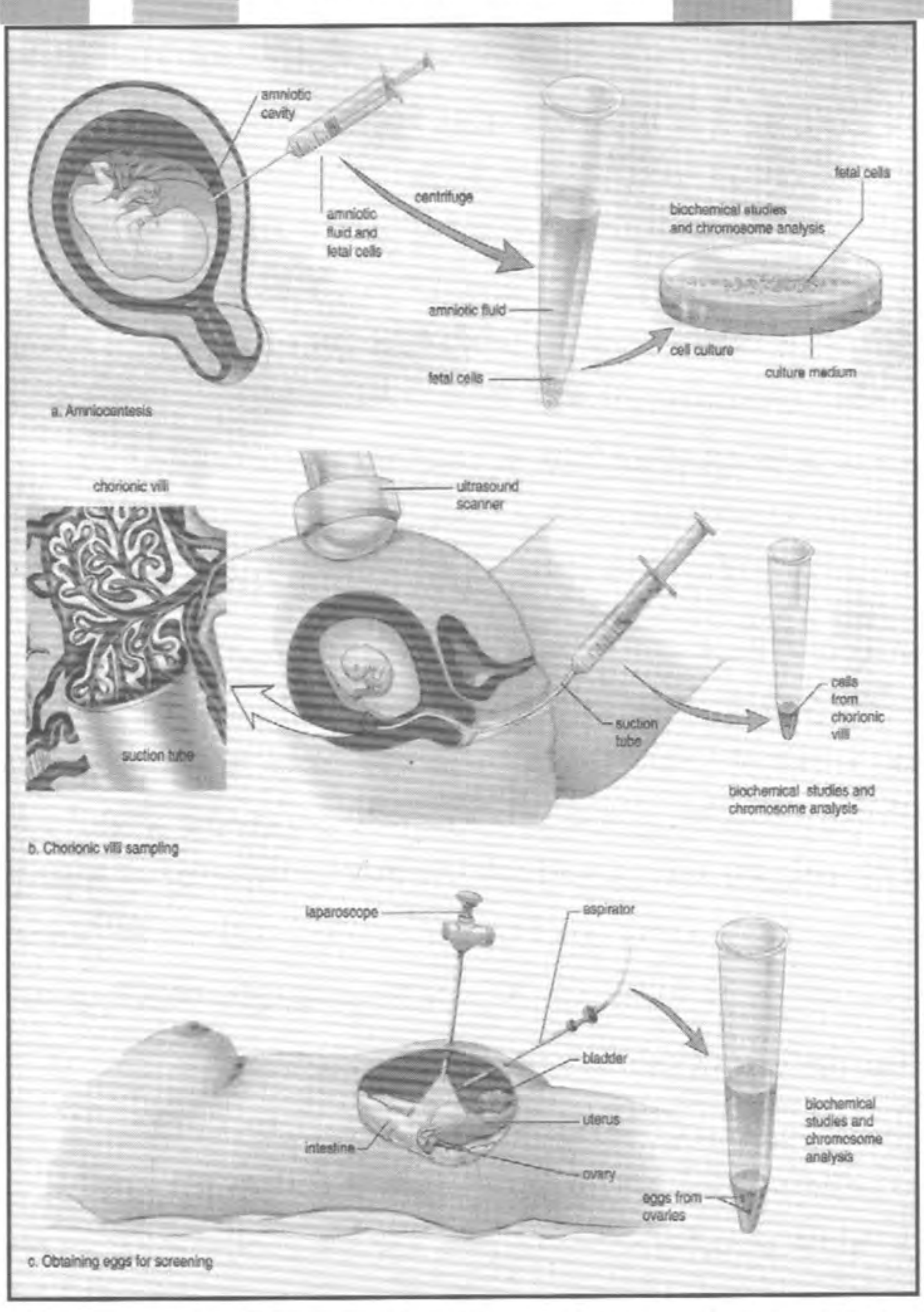
لقد استعملت هذه التقنية في تشخيص الأمراض الوراثية، والوراثة التطورية، إذ نجحت بالتعامل مع DNA الجنين، فبعد إدخال حقنة طبية خاصة خلال جداري البطن والرحم، وأخذ عيّنة من الخلايا الموجودة في السائل الأمنيوسي المُحيط بالجنين. يتم إكثار هذه الخلايا واستخلاص الـDNA، ثمّ تُطبّق البصمة الجينية (شكل 8 – 9). ويُمكن أن تؤخذ العينة من الزغابات الكوريونية CVS (Chorionic villi sampling) أو من البويضات المسحوبة من المبايض (شكل 8 – 10). كما استعملت لتحليل عينات الـDNA المستخلص من عظام المومياءات القديمة وحتى التي بعمر 30000 سنة في

عينات إنسان النياندرتال، إذ أظهر هذا التحليل بأن الإنسان الحديث يختلف جينياً عن النياندرتال. واستعملت أيضاً وبشكلٍ فعّال في علم الطب العدلي كأداة علمية مهمة في حل لغز الكثير من الجرائم المعتمدة على عينات النُطف المأخوذة من مهبل الضحية المُغتصبة، أو خلايا جلد المجرم التي أُخذت من أظافر الضحية، أو بقعة دم، أو شعرة، وغيرها من الأدلّة المتوفرة في مسرح الجريمة. ولكن يجب تحاشي تلوّث العينة قدر الإمكان.



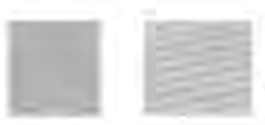
شكل (8 – 9). تقنية اختبار السائل الأمنيوسي المحيط بالجنين

في البداية يُحدّد موقع الجنين بوساطة جهاز الموجات فوق الصوتية، ثمّ تُدخل حقنة طبية خاصة عبر جدار البطن والرحم لسحب السائل والخلايا الجنينية لإجراء التحليلات الخلوية الوراثية والجزيئية.



شكل (8 – 10). الحصول على العينات اللازمة لإجراء بصمة الـDNA من بطن الأم

a. من السائل الأمنيوسي. b. من الزغابات الكوريونية. c. من البويضات.



خطوات إجراء البصمة الوراثية للـDNA:

نحتاج في كثير من الأحيان إجراء بصمة الـDNA لعينة ما، إذ يتطلّب ذلك قدر الإمكان إلى عينة قليلة التلف، ففي الظروف التي تساعد على تلف العينات، فإن التكسّرات الحاصلة في الـDNA تؤدّي إلى تحلل الـDNA بسرعة لجزيئات أصغر مُسبّبة خسارة العينة. ولحسن الحظ لا يؤدي لتلف النسبي إلى ظهور أشرطة كاذبة في بصمة الـDNA، إذ إن أشرطة الـDNA تتجّزأ فراداً بشكل عشوائي، فتتلف كل خلية على نحو مختلف.

وتتم الخطوات التجريبية لهذا لتحليل في المختبرات الجنائية كما هو موضّح أدناه:

1. استخلاص الـDNA (DNA extraction):

يمكن استخلاص الـDNA من أغلب أنسجة الإنسان تقريباً، إذ إن مصدر الـDNA الموجود في مسرح الجريمة قد يتضمّن الدم أو النُطف أو نسيج من الضحية الميتة (Deceased victim)، أو خلايا موجودة في بُصيلة الشعرة أو اللُعاب، ويتم مقارنة الـDNA المستخلص من الأدلة المتوفرة (عينات الدليل Evidence samples) مع عينات المصدر (Reference samples) المستخلصة من الدم، والتي تعود لأفراد معروفين (المُشتبه بهم).

2. تقطيع الـDNA بإنزيم قاطع

Digestion of DNA with a restriction endonuclease

يتم معاملة الـDNA المستخلص مع إنزيم قاطع، وهو الإنزيم الذي سوف يقطّع الشريط المزدوج للـDNA، إذ يوجد التسلسل المتخصص الذي يُميّزه هذا الإنزيم، مع العلم بأن الإنزيم المستعمل يجب أن لا يقطع التسلسلات المتكررة من داخلها، بل تكون أماكن القطع على جوانبها. وأكثر الإنزيمات استعمالاً في مجال تحليل الـDNA الجنائي هو *Hae*III الذي يقطع الـDNA عند التسلسل 5′- GG↓CC – 3′. كذلك تستعمل إنزيمات أخرى في هذا المجال.

3. الترحيل الكهربائي في هلام الأجاروز Agarose gel electrophoresis:

بعد تقطيع الـDNA فإن القطع المتكونة يتم فصلها اعتماداً على الحجم في الهُلام، وخلال الترحيل فإن الـDNA سوف يُهاجر باتجاه القطب الموجب. فالجزيئات الصغيرة من الـDNA تتحرّك بشكلٍ أسرع من الكبيرة خلال ثقوب مادة الهُلام، وينتج عن ذلك انفصال وتوزيع لقطع الـDNA اعتماداً على الحجم الجزيئي بحيث تهاجر قطع الـDNA الصغيرة لمسافة أكبر ابتداءً من حفرة تحميل العينة.

4. تحضير وصمة سوذرن Preparation of Southern blot:

ما يلي عملية الترحيل الكهربائي هو مسخ الـDNA وهو لا يزال في هُلام الأجاروز، من خلال تغطيس الهُلام في محلول قاعدي. ويلي ذلك معادلة المحلول القاعدي ونقل الأشرطة المفردة من الـDNA إلى سطح غشاء التهجين، إذ ينتقل الـDNA على الغشاء بشكل مُطابق له عندما كان في الهُلام.

5. التهجين مع مجس مُعلم إشعاعيا

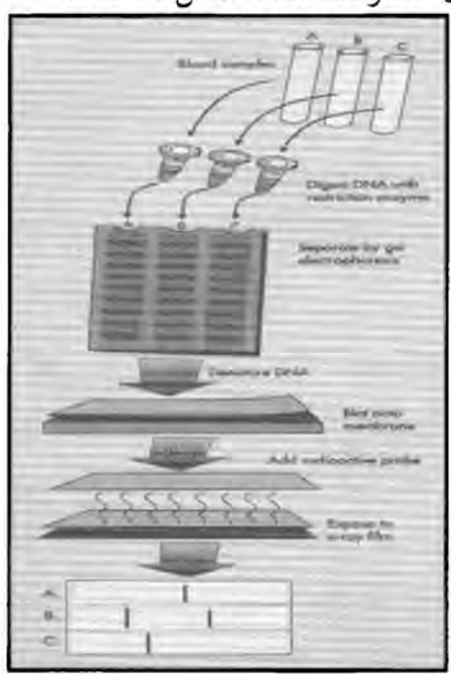
Hybridization with radioactive probe

يُحدِّد الهدف من بصمة الـDNA استعمال مجس موقع مفرد أو مجس متعدد المواقع. إن مجس الموقع المفرد هو تسلسل من الـDNA أو الـRNA قادر على التهجين (كتكوين مزدوجات DNA – DNA أو RNA – RNA) مع قطع خاصة من الـDNA بوصمة سوذرن. إن مجسات الموقع المفرد يتم تعليمها في العادة بنظير مُشع لسهولة الكشف، وتُختار لتحديد موقع وراثي واحد متنوّع على كروموسوم بشري مفرد. يتم تغطيس غشاء وصمة سوذرن (الخطوة 4) في محلول يحتوي على المجس المُعلّم إشعاعياً تحت ظروف حرارية وتراكيز ملحية ملائمة لعملية التهجين الجزيئي. بعد التهجين يتم غسل المجسّات الغير مرتبطة، ولهذا يبقى فقط المجس المُعلّم مرتبطاً مع الـDNA المُستهدف.

6. تحديد الـRFLPs بوساطة التصوير الإشعاعي الذاتي

Detection of RFLPs via autoradiography

يتم تحديد موقع المجس المُشع المُتهجّن مع الغشاء بوساطة التصوير الإشعاعي الذاتي. في هذه التقنية يوضع الغشاء المغسول فيها بعد تحت فلم حسّاس للأشعة السينية (X-ray)، إذ يُطبع على الفلم موقع تحلّل المادة المُشعّة. بعد التعريض وتوضيح الفلم فإن النتائج المُسجّلة لتهجين سوذرن يُطلق عليها صورة شعاعية ذاتية (Autoradiograph) أو تُختصر Autorad (شكل 8 – 11).

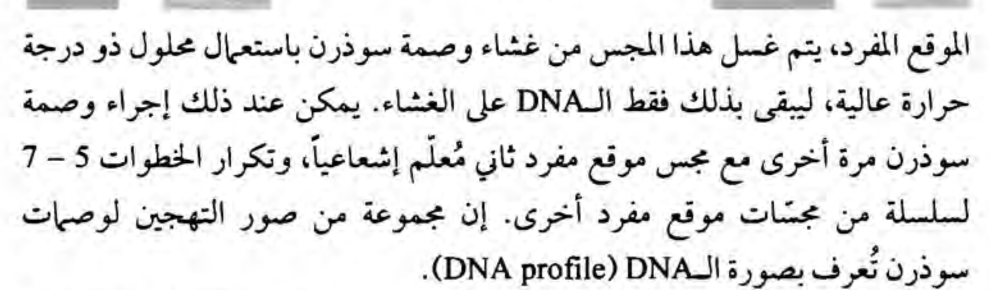


شكل (8 – 11). تقنية وصمة سوذرن (Southern blotting) لتهجين الـDNA المستخلص من الدم والمُرحّل على هلام الأجاروز

7. إعادة وصمة سوذرن مع مجسات إضافية

Re-probe southern blot with additional probes

في التحليل الجنائي النموذجي للـDNA فإن تنوّعات الـDNA على بعض الكروموسومات المختلفة يتم توصيفها، فبعد الحصول على صورة Autorad لمجس



الموقع المفرد، يتم غسل هذا المجس من غشاء وصمة سوذرن باستعمال محلول ذو درجة حرارة عالية، ليبقى بذلك فقط الـDNA على الغشاء. يمكن عند ذلك إجراء وصمة سوذرن مرة أخرى مع مجس موقع مفرد ثاني مُعلّم إشعاعياً، وتكرار الخطوات 5 – 7 لسلسلة من مجسّات موقع مفرد أخرى. إن مجموعة من صور التهجين لوصمات سوذرن تُعرف بصورة الـDNA (DNA profile).

يستعمل في الوقت الحاضر أكثر من 12 مجس من مجسّات VNTR المختلفة في التحقيقات الجنائية النموذجية (شكل 8 – 12)، إذ يتواجد تسلسل أغلب هذه المجسّات على كروموسومات مختلفة، وكل مجس يمكن أن يستعمل لإظهار نمط VNTR لموقع جيني خاص. كما أن التحقيقات الجنائية النموذجية تستعمل 4 – 6 مجسّات VNTR لإعطاء نمط أو بصمة تفصيلية جينية دقيقة .

8. يتم تفسير بصمة الـDNA المأخوذة من مسرح الجريمة ومقارنتها مع الـDNA المستخلص من الدم أو النُطف المأخوذة مباشرةً من الشخص المُشتبه به.



شكل (8 – 12). بصمة DNA لحالة جنائية

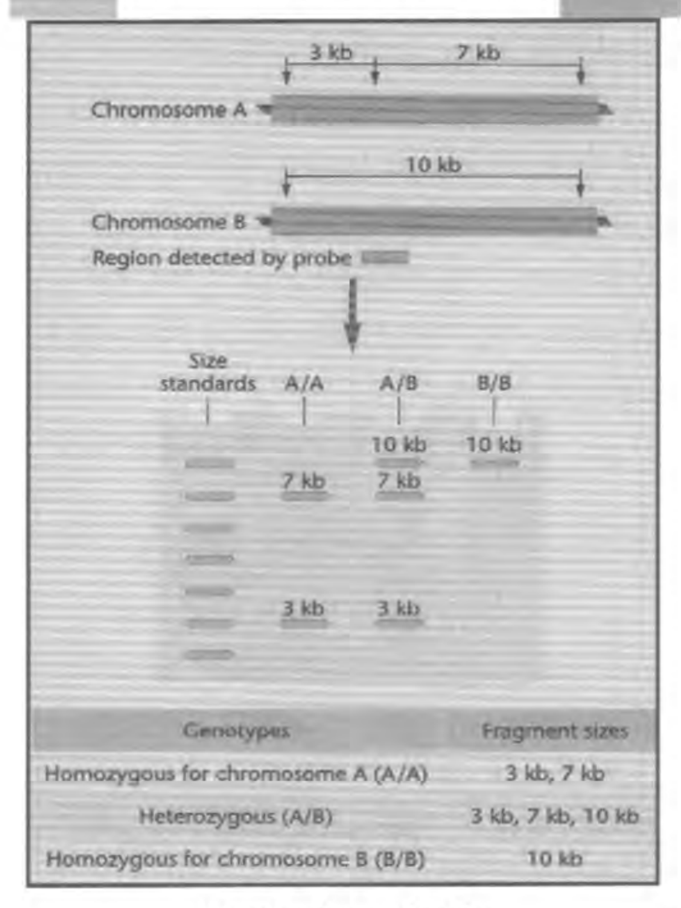
إن نمط الـDNA للمُشتبه به رقم 2 (S2) يتطابق مع نمط الـDNA المستخلص من الدم المُتحصّل عليه كعينة دليل (VS) E. في حين لا تتطابق بصمة الـDNA للمُشتبه به الأول (S1) مع عينة الدليل.

الـRFLPs كمعلّمات وراثية RFLPs as genetic markers:

يحدث التباين في التسلسل النيوكليوتيدي خلال الجينوم البشري (في الغالب في المناطق غير المُشفّرة Noncoding regions) بتردد بحدود 1 لكل 200 نيوكليوتيدة.

وبتغيّر التسلسل في موقع خاص، فإن تغيّر نيوكليوتيدة مفردة يمكن أن يكوّن أو يحذف موقع قطع إنزيمي (راجع الفصل السادس). وقد يحدث تكوين موقع إنزيمي بسبب مثل هذا التغيّر على أحد الكروموسومات، ولكن سوف يغيب عن نظيره، ولذلك فإن الكروموسومين يمكن تمييزهما عن بعضهما من خلال نمطيهما عند إجراء التقطيع الإنزيمي، وإجراء وصمة سوذرن (شكل 8 – 13). فمثلاً المنطقة في كرموسوم A المُبيّنة في الشكل تحتوي على ثلاثة مواقع قطع للإنزيم *Bam*HI، أما نظيره الكروموسوم B فإنه يحتوي على موقعين. فعند قطع كروموسوم A بالإنزيم *Bam*HI تتكوّن قطعتين وهما 3 kb و 7 kb (على افتراض أن الحجم الجزيئي للقطعة يساوي 10 Kb). في حين تتكوّن قطعة واحدة حجمها 10 kb عند قطع الكروموسوم المُناظر. وباستعمال مجس من هذه المنطقة الكروموسومية فسوف يُعطي وصمة سوذرن كما هي واضحة في الشكل سالف الذكر. إن مثل هذا التباين في أطوال قطع الـDNA المتولّدة بالقطع بإنزيم قاطع يسمّى RFLPs (Restriction Fragment Length Polymorphisms). يُعدّ الـRFLPs شائعاً ويمثّل تغايراً طبيعياً، ويحدث من خلال التغايرات التي تحدث في زوج نيوكليوتيدي واحد، أو من خلال حذف أو إدغام زوج قاعدي أو أكثر. لقد تمّ تحديد بعض الآلاف من الـRFLPs في جينوم الإنسان، ولوحظ عدد كبير منها على كروموسومات مفردة، إذ إن هذه التغايرات تورث كأليلات ذات سيادة مشتركة (Codominant alleles). ويمكن رسم الخريطة عند مناطق خاصة على كروموسومات مُنفردة، وتستعمل لتعقيب توريث الأمراض الوراثية وصفات أخرى من جيل إلى جيل في عوائل معيّنة.





Genotypes	Fragment sizes
Homozygous for chromosome A (A/A)	3 kb, 7 kb
Heterozygous (A/B)	3 kb, 7 kb, 10 kb
Homozygous for chromosome B (B/B)	10 kb

شكل (8 – 13). RFLPs

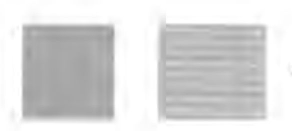
إن الأليلات على كروموسوم A و B تمثّل قطع DNA من كروموسومات متناظرة. إن المنطقة التي تتهجّن مع المجس موضحة أعلاه. الأسهم تُشير إلى موقع القطع الإنزيمي التي تميّز الأليلات. إن مواقع القطع الثلاث على الكروموسوم A تولّد قطع 7 kb و 3 kb. يوجد على كروموسوم B موقعين للقطع فقط تولّد قطعة 10 kb. غياب موقع قطع على B قد ينتج عن طفرة في قاعدة مفردة ضمن موقع القطع الإنزيمي. وبسبب تلك الاختلافات في مواقع القطع التي تورث بأسلوب السيادة المشاركة، سوف يوجد 3 أنماط وراثية، وهي: AA ، AB ، BB. إن التركيب الأليلي لأي فرد يمكن تحديده بوساطة التقطيع الإنزيمي للـDNA الجينومي (المُتحصّل عليه من عينة دم أو أرومات ليفية جلدية Fibroblast)، ثمّ إجراء الترحيل الكهربائي، ثمّ النقل إلى أغشية التهجين وإجراء التهجين مع مجس مناسب لتطبيق وصمة سوذرن.

يُطبّق إجراء الـRFLPs في عدد من تجارب علم الأحياء الجزيئي، أهمها فحص الطفرات الجينية في الجينوم البشري، والتي تؤدّي في الغالب إلى أمراض وراثية، إذ يظهر لها نمط خاص من الـRFLPs. ويُعدُّ هذا النمط تأكيداً على أن الشخص يعاني من المرض الوراثي، ولكن عدد الأمراض التي يمكن دراستها بهذه الطريقة محدود، ليس بسبب قلّة إظهار النمط RFLP، ولكن لقصور معلوماتنا حول الجينات وعن تركيبها وما تدل عليه الأنماط الناتجة عن هذا الإجراء. ورغم ذلك برهنت هذه الطريقة على فعّاليتها في تشخيص عدد من الأمراض مثل الثلاسيميا (Thalassaemia) الناتج عن خلل في جينات الجلوبين (Globin)، وفي تشخيص بعض أنواع الهيموفيليا (Haemophilia).

أما الطريقة البديلة فهي التي تسمّى تحليل الأنماط المرتبطة (RFLP Linkage analysis)، والتي لا تعتمد على الـRFLP مباشرةً في الجين المعطوب، وإنما تعتمد على تمييز القطع الإنزيمية متعدّدة الأطوال (RFLP) الموجودة في مكانٍ ما في محيط أو بجوار الجين المعطوب. فإذا كانت هذه القطع (RFLPs) قريبة جداً فإنه من المحتمل أن تورث مع الجين المعطوب. وإن أحداث إعادة التركيب التي تنشأ أثناء الانقسام الاختزالي (Meiosis) سوف لا تفصل هذه القطع (RFLP) عن الجين، وعليه يُعدُّ وجود هذه القطع مؤشراً واضحاً على الجين المعطوب.

بصمات الـDNA   DNA Fingerprints:

كما ذكرنا سابقاً فإن الـRFLPs تكون شائعة في جينوم الإنسان، ويمكن استعمالها كعلامات وراثية. كما أن هنالك نوعاً آخر من التغاير النيوكليوتيدي تمّ اكتشافه في أواسط الثمانينيات، والذي يعتمد على التغاير في طول عناقيد تسلسلات الـDNA المترادفة (Repetitive DNA sequence clusters). هذه التسلسلات وتنوّعات أخرى في DNA الإنسان أدّت إلى تطوّر طرق لتشخيص الأفراد، وأُسست درجات من القرابة الوراثية للأفراد. واحدة من تلك التقنيات سُمّيت بصمة الـDNA. وفيما يلي وصف لأنواع تلك البصمات.



طرق تحليل البصمة الوراثية:

بعد جمع الآثار البيولوجية والمُخلّفات البشرية من مسرح الجريمة أو جسم الضحية، كالدم أو اللعاب أو السائل المنوي أو الإفرازات المهبلية أو بقايا نسيجية مختلفة كبصيلات الشعر وبقايا الأظافر والجلد وغيرها، فإنه يتم تحديد الأسلوب الذي يُتّبع لتطبيق البصمة الوراثية بناءً على طبيعة العينة وكميّتها. وبشكلٍ عام يستغرق عمل البصمة الوراثية مدّة تتراوح بين 5 أيام و 3 أسابيع حسب طبيعة الحادث والطرق المعتمدة في استخلاص الـDNA وتوصيفه.

إن من أهم طرق تحليل بصمة الـDNA ما يأتي:

أولا: البصمة الوراثية المعتمدة على استعمال مناطق الـDNA مختلفة الأطوال والانتشار (RFLP – VNTR method):

تعتمد هذه الطريقة في تمييز الأشخاص على التباينات في الـDNA طبقاً لطول أو عدد تكرارات معينة، أو ما يُسمّى بالتوابع الكروموسومية الصغيرة، إذ نتجت هذه الاختلافات عن طفرات وراثية سابقة، أدّت إلى عدم تواجد المواقع التي تميّزها الإنزيمات القاطعة، وبذلك فإن المنطقة نفسها في الجينوم تُقطع بوساطة الإنزيم القاطع نفسه إلى أجزاء مختلفة في الأشخاص المختلفين، أي أنه على الرغم من اختلاف هذه القطع في أطوالها، إلاّ أن كل منها يحتوي بداخله على تسلسلات من القواعد بحدود 15 – 10 قاعدة مشتركة بين الكثير من هذه القطع. إن خير مثال على مناطق RFLPs هو بعض التسلسلات المتكررة التي تورث بصورة ترادفية، والتي تختلف من شخصٍ لآخر (VNTR) (شكل 8 – 14)، سواء بعدد التكرارات أو بطول التسلسل نفسه، إذ تورث هذه الأنماط أو العلامات الوراثية من الأب والأم بالتساوي، كما استعملت مجسّات VNTR المُشتقّة من جين الميوغلوبين في الإنسان لزيادة القدرة التمييزية في بصمة الـDNA (راجع الفصل السابع لمزيد من المعلومات).

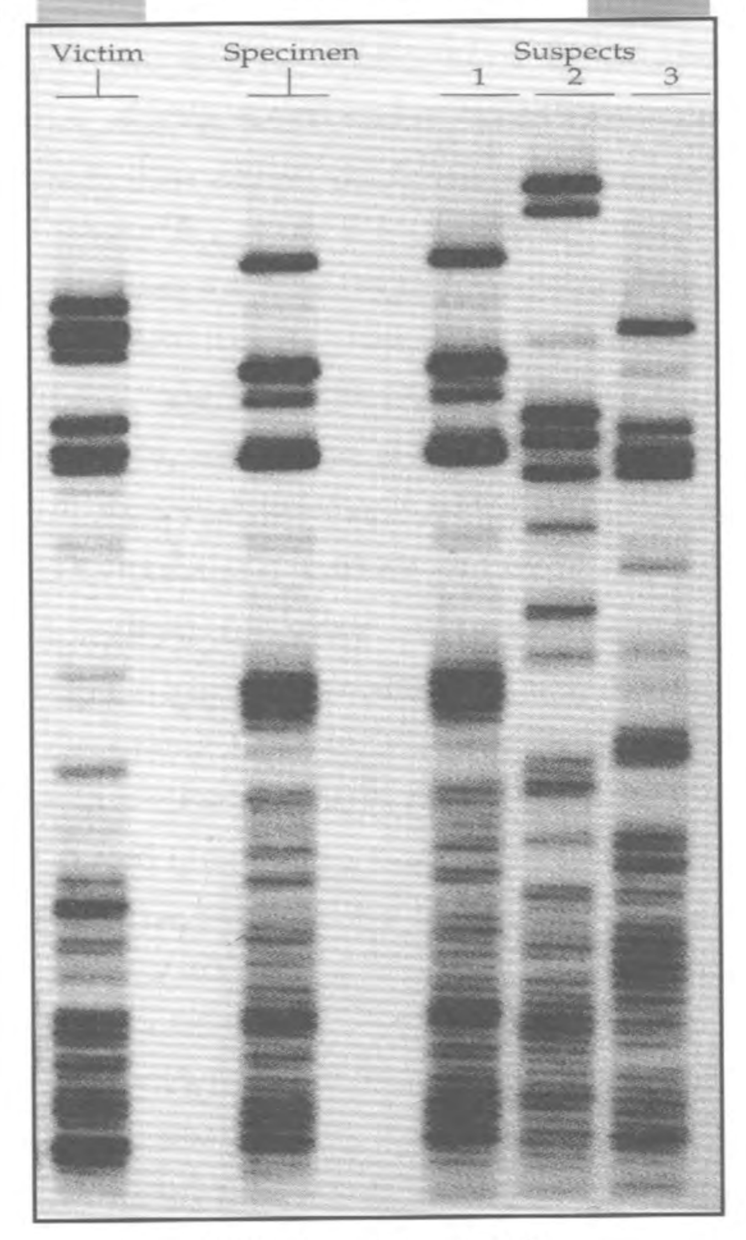
(أ)	AATTGC AATTGC AATTGC
(ب)	AATTGC AATTGC AATTGC AATTGC AATTGC

شكل (8 – 14). التباين في تكرار التسلسلات المتكررة المترادفة

إن طول التسلسلات في الشخصين مُكوّن من 6 قواعد، لكن التكرارات في DNA الشخص أ هو 3، أما في الشخص ب فهو 5.

بعد استخلاص وتنقية الـDNA بشكل جيد، يتم تقطيعه بإنزيم قاطع، وتُطبّق وصمة سوذرن مع مجسّات محددة طبقاً للحالة والعينة، ثمّ إبداء الرأي الفني بالنتيجة.

تعتمد القدرة التميزية لبصمة الـDNA المأخوذة بهذه الطريقة على عدد مواقع الاختلافات وعلى عدد المرّات التي تتكرّر بها هذه الاختلافات بين الأشخاص. وعند إجراء تحليل لعينات بيولوجية من عدّة أشخاص، نجد أنه إذا كان الاختلاف في موقع واحد فإن الحد الأقصى للحُزم التي يمكن مشاهدتها هو اثنتان، واحدة على كل كروموسوم في زوج الكروموسومات المتماثلة، إذ تمثّل الحُزمة الأولى ما يرثه الشخص من أبيه، بينما تمثّل الثانية ما يرثه من أمه. وعلى الرغم من صعوبة استعمال وتفسير نتائج المجسّات متعددة المواقع عند استعمالها في هذه الطريقة، كونها تُعطي نمطاً متعدّد الحزم قد يصل إلى 30 أو حتى 200 حزمة منتشرة في مواقع مختلفة (Bar-code patterns)، إلاّ أن العلماء يُفضّلونها لأنها تُعطي قدرة تميزية عالية عند تحليل بصمة الـDNA، وخصوصاً في القضايا الجنائية وإثبات النسب، إذ يمكن تحديد هوية الفرد بصورة تكاد تكون قطعية. ففي الشكل (8 – 15) مثلاً يظهر أحد أنواع بصمات الـDNA، إذ تمّ إجرائها من بقعة دم (Blood stain) وُجدت في مسرح الجريمة، وقد تطابقت مع بصمة DNA المُشتبه به رقم 1، ولكنها لم تتطابق مع بصمة الـDNA للمُشتبهين 2 و 3، ممّا يؤكّد تورّط المُشتبه به الأول في هذه الجريمة.



شكل (8 – 15). بصمة DNA

طُبّقت بالاعتماد على الـDNA المعزول من بقعة دم وُجدت في موقع الجريمة، ومن الدم المُتحصّل عليه من ثلاثة أشخاص مُشتبه بهم.

في عام 1987 رفض قاضي فلوريدا الطلب المُقدّم من قبل النائب العام لإحضار التحليل الإحصائي حول دليل الـDNA ضد أحد المتهمين بالاغتصاب، وبعد محاكمة خاطئة، أُطلق سراح المُشتبه به. وبعد مرور 3 أشهر أُعيد المتهم إلى المحكمة بسبب اتّهامه بجريمة اغتصاب أخرى. في هذا الوقت سمح القاضي للنائب العام بإحضار التحليل الإحصائي للمعلومات المعتمدة على مسوحات سكانية مناسبة. لقد أظهر التحليل بأن بصمة الـDNA المُحضَرة من النُطف المأخوذة من الضحية تكون باحتمالية تقارب 1 / 10 بليون لتطابق بصمة DNA أخرى لغير المتهم بالصدفة، وهذا يعني تطابق البصمة المُحضَّرة من مسرح الجريمة مع بصمة المتهم بشكلٍ يكادُ يكون مُطلقاً دون شك، ولذلك فقد تمّ بالفعل إدانة المتهم بجريمة الاغتصاب.

سلبيات البصمة الوراثية المُعتمدة على الـRFLP – VNTR:

في الغالب تتطلّب طريقة الـRFLP – VNTR عينة كبيرة نسبياً من الـDNA محفوظة بحالة جيدة لا تؤدّي إلى تلفها. وطالما أن من الصعوبة الحصول على عينة مناسبة في المُخلّفات الجنائية لمسرح الجريمة من ناحية قلّة العينات واختلافها أو تعرّضها لعوامل جوية بيئية مختلفة من الحرارة والضوء والرطوبة وغيرها، الأمر الذي يؤدي إلى تحلّل الـDNA في تلك الكميات الصغيرة، وضعف صلاحيتها، ممّا يحدُّ من استعمال تلك الطريقة، بحيث نضطر هنا للجوء إلى استعمال الـPCR للتقليل من الأثر التدميري الذي حلَّ بالـDNA بفعل أشعة الشمس أو ارتفاع درجة الحرارة والرطوبة مثلاً. فضلاً عن ذلك، هنالك سلبيات أخرى تتمثّل في أن بعض تكرارات VNTR قد تُبدي بعض التشابه بين الأفراد، لذلك لا بُدّ من استعمال مجسّات أكثر حساسية، مثل: YNH24 أو EDF64 أو CMM86 وغيرها.

كما أن بعض المجسّات المستعملة في هذه الطريقة يمكن أن ترتبط مع تسلسلات DNA يشترك فيها الإنسان مع حيوانات أخرى كالكلاب والقطط والطيور، وهذا يُزيد من احتمالية ظهور بصمة DNA خاطئة، الأمر الذي يستدعي ضرورة الحذر وتحديد نوع الكائن الحي عند تحليل بصمة الـDNA.



وأخيراً تُعدُّ هذه الطريقة مُستهلكة للوقت، إذ إن غشاء التهجين يجب أن يُهجّن بشكلٍ متسلسل مع 4 – 5 مجسّات مختلفة، كل واحد منها يُشخّص تسلسلات مختلفة من الجينوم خصوصاً وأن كل مجس يجب أن يُزال بشكل كامل بالغسل قبل استعمال المجس التالي وهكذا. ولهذا فإن العملية بشكلٍ كامل قد تستغرق أسابيع.

ثانيا: البصمة الوراثية المعتمدة على استعمال الـPCR والمتكررات المترادفة القصيرة (PCR – STR method):

بسبب السلبيات التي ذُكرت في الطريقة السابقة، لجأ العلماء إلى تطوير ستراتيجية مساندة لاستغلال العينات القليلة أو القديمة، والتي تعتمد على الـPCR لإكثار مناطق من الـDNA تُعرف باسم المتكررات المترادفة القصيرة STRs (Short tandem repeats)، إذ يحتوي كل من هذه المتكررات على تسلسل قصير مكوّن من 9 – 2 زوج قاعدي، ويُعيد هذا الجزء نفسه عدداً من المرات يختلف من شخص لآخر، والتي تُعدّ من المميزات الفردية الثابتة والقوية جداً.

تمّ تطوير 13 تسلسل رباعي (تكرارات من أزواج قاعدية رباعية) من STRs كلوحة توسيم تستعمل من قبل FBI لتكوين موقع معلومات لأنماط الـDNA في التحقيقات الإجرامية (شكل 8 – 16).



شكل (8 – 16). بصمة DNA لحالة جنائية

نمط الـDNA للمُشتبه 2 (S2) يُطابق نمط بقعة الدم المُتحصّل عليها من الدليل E.

ونتيجةً لذلك فقد حلّت STRs محل الـVNTRs في أغلب المختبرات الجنائية، لكونها أرخص، وأقل جهداً، وأسرع إنجازاً من تحليل RFLP، وقد حلّت محل تنميط VNTR في أغلب المختبرات المتعلّقة باختبار الأبوّة.

عندما يتم تكوين التركيب الوراثي للأليلات لكل المواقع الثلاثة عشر للـ CODIS STR (كلها 26 أليل) لإنتاج نمط كامل من STR، فإن الفرصة النموذجية في كون أي شخص يمتلك هذا التشكيل هي 1 في 100 ترليون. وطالما أن عدد كل سكان العالم هو فقط بحدود 6 بليون، فإنه من السهل معرفة لماذا يُشار إلى تحليل STR في الغالب بالاختبار التشخيصي لـDNA الإنسان (Human DNA identification testing).

كما يُستعمل في هذه التقنية مجسّات مُعلّمة بالنظائر المُشعّة، وكلما زاد التطابق بين العينة المعروفة والعينة المجهولة (الدليل) كان ذلك شاهداً ضد الشخص المتهم.

يستهدف في الـPCRs تسلسلات متغايرة تختلف عن التسلسلات المتغايرة المستهدفة في تقنيات الـRFLPs، إذ إن المواقع المستهدفة تتكوّن غالباً من 7 – 9 من التسلسلات المتكررة المترادفة. لذلك تعتمد هذه الطريقة على تضخيم التوابع الكروموسومية الدقيقة.

يمكن الحصول على نتائج جيدة باستعمال طريقة الـSTR – PCR من أي عينة بشرية تحتوي على DNA، ولو كانت خلية واحدة من بصيلة شعرة أو رذاذ عطاس أو بقايا لُعاب على ظهر طابع بريدي، أو لعاب يستعمل في لصق حافّة ظرف رسالة، أو بقايا لعاب على عقب سيجارة أو حافة كوب شراب. وقد نجحت هذه الطريقة في الاستفادة من عينات خلايا متنوّعة تمّ تخزينها لأكثر من 10 سنوات، كما أنها أعطت نتائج ممتازة في حالات تعفن وتحلّل العينات كالهياكل العظمية للمومياء المصرية التي تجاوز عمرها 2400 سنة. وكان لذلك الأثر البالغ في حالات إعادة التحقيق في قضايا طُويت ملفاتها أو كُشف النقاب عنها بعد فترة طويلة من وقوعها.

ثالثا: البصمة الوراثية المعتمدة على DNA المايتوكوندريا mtDNA:

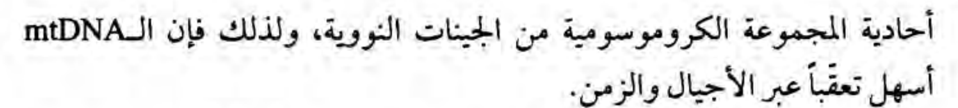
يتضمّن هذا التحليل دراسة تسلسل mtDNA (حسب طريقة سانجر) بالاعتماد على PCR، إذ يُستعمل الـPCR لتوليد قالب الـDNA لدراسة التسلسل. يُعدُّ هذا

التحليل أكثر قوّة من تحليل الـSTR، وذلك لأن المايتوكوندريا المسؤولة عن توليد الطاقة في الخلية تتواجد بأعداد تصل إلى الآلاف في الخلية الواحدة، وهذا يجعل منها مصدراً مهماً وضخماً وثابتاً للمعلومات الجينية مقارنةً بالـDNA الموجود في النواة (راجع الفصل الثالث لمزيد من المعلومات). وحيث أنه لا توجد تسلسلات متكررة في mtDNA يُفضّل بعض العلماء استعمال جزيئات DNA معيّنة لتصنيف بعض التسلسلات المتباينة في القواعد الأساسية من الـmtDNA مثل AGTCGA، إذ استعملت هذه الطريقة لتحليل بقايا أو أشلاء بشرية من أنسجة عظمية زاد عمرها على 7 آلاف عام لحل بعض الألغاز التاريخية الغامضة. وعليه تُعدُّ بصمة mtDNA الخيار الوحيد، إذا ما أُريد التعرّف على العلاقة في قرابة النسب بين أجيال حيّة مُعاصرة وأخرى بائدة.

وبشكل عام فإن جينوم المايتوكوندريا كما هو الحال في جينوم النواة يتعرّض إلى تراكمات بطيئة للتغيّرات العشوائية في الـDNA عبر الزمن، وهذه التغيرات يمكن أن تستعمل كمقاييس للزمن وللمسافات التطورية بين الكائنات. ولكن جينوم المايتوكوندريا يتميّز باختلافين مهمّين، وهما:

1. إن الحركات الزمنية (تكّات ساعة الزمن Clock ticks) لجينوم المايتوكوندريا أسرع بعشرة أضعاف مقارنةً بالحركات الزمنية لجينوم النواة، وبسبب هذه السرعة فإن mtDNA يُعدُّ مناسباً في تعقّب أدلّة حديثة أكثر تُقاس لآلاف من السنوات الماضية.
2. في الفقريات كل المايتوكوندريا هي من منشأ أمومي (Maternal origin) (وراثة سايتوبلازمية أو تُسمّى تأثير أمومي، لأنها تورث من الأمهات فقط وليس الآباء(*)). وهذا يُلغي إمكانية حدوث التغيّرات في التسلسل النيوكليوتيدي الناجمة عن إعادة التشكيل (Recombination) الجنسي، بحيث أن زوج من الأفراد المتزاوجين يمكن أن ينقلون نوع واحد من الـmtDNA ولكنهم ينقلون أربعة أطقم

(*) نجد من الطريف هنا الإشارة إلى المثل الشعبي الذي يقول: "ثلثين الولد على خالة". وعلى ما يبدو أنه استُنتج من الملاحظات العامة لتشابه صفات النسل مع أخوالهم، والناتج عن هذا النوع من التوريث.

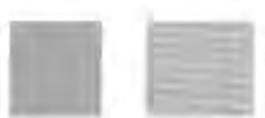
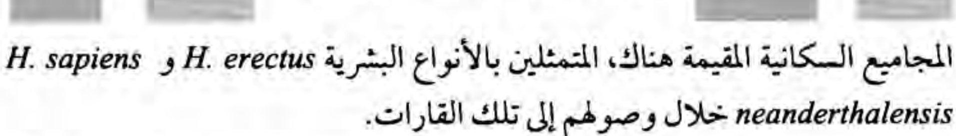


أحادية المجموعة الكروموسومية من الجينات النووية، ولذلك فإن الـmtDNA أسهل تعقّباً عبر الأجيال والزمن.

لقد قامت الباحثة Rebecca Cann وزملائها من جامعة كاليفورنيا بجمع الـmtDNA من 147 امرأة من مجاميع سكانية مختلفة تعود لأفريقيا وآسيا وأوربا وأستراليا ونيوغينيا، إذ قُطّع الـDNA، وتم تحديد ومقارنة نمط القطع وإنجاز بصمة الـmtDNA ووضع شجرة الـDNA للمايتوكوندريا، إذ كانت النتائج غير متوقّعة ومثيرة للعجب، تمخّض عنها عدد من المسائل، وهي:

1. بالاعتماد على الشجرة فإن هنالك سلف مشترك مفرد من الـDNA أصبح شائعاً يُعرف بمايتوكوندريا حوّاء (Mitochondrial Eve)، وهذا لا يعني أن أنثى واحدة فقط كانت المكوّن لنا، ولكن بدلاً من ذلك فإنه من بين مجموعة سكانية (من المحتمل أن تبلغ بعض الآلاف) وبالصدفة فقط مجموعة واحدة من جينات المايتوكوندريا قد مُرّرت.
2. إن هذه الأنثى عاشت قبل 200000 ألف سنة مضت (± 50 سنة)، وهذه النتيجة اعتمدت على معدّل الطفرة المعروف في الـmtDNA.
3. إنها عاشت في أفريقيا، وأساس هذا الاستنتاج هو أن المجموعة السكانية الأفريقية أكثر تنوّعاً من غيرها، وهذا يُشير ببساطة إلى أن وجود هذه المجموعة كان الأقدم.
4. بالاعتماد على درجة التغاير بين المجاميع غير الأفريقية، فإن المجاميع السكانية المؤسسة الأصلية يمكن أن تكون قد تركت أفريقيا احتمالاً بحدود أكثر من 100000 سنة مضت.
5. لا يوجد دليل على دخول الـmtDNA جديد سواء في المجاميع السكانية التي بقيت في أفريقيا أو التي استوطنت قارات أخرى.

وإذا أُسندت هذه النتائج بمعلومات إضافية، فإننا سنحصل على صورة واضحة حول سكان البشر الحديث الذين كانوا في أفريقيا قبل 200000 سنة مضت، والذين بدءوا بالهجرة خلال آسيا إلى أوربا بحدود 100000 سنة مضت، وحلّوا بدلاً من

المجاميع السكانية المقيمة هناك، المتمثلين بالأنواع البشرية *H. erectus* و *H. sapiens neanderthalensis* خلال وصولهم إلى تلك القارات.

ومن الجدير بالذكر أنه في إحدى الدراسات التي تضمّنت 21 إنساناً يعودون إلى عروق مختلفة (Different races)، قد وُجِد بأن 14 فرداً منهم يمتلكون 64 موقع قطع (Restriction sites) مُتماثل في الـmtDNA. في حين أظهر 7 أفراد واحداً أو أكثر من الاختلافات، وأنه من بين العينات البشرية المُختارة عشوائياً لوحظ ما يُقارب 1 / 250 زوج قاعدي للـmtDNA كان مختلفاً.

إن القيمة الجنائية للـmtDNA تقع في الجزء المسمّى D – Loop والتي يبلغ طولها تقريباً 1100 bp وتقع في المنطقة غير المشفّرة، إذ يوجد في هذا الجزء منطقتين شديدتي التغاير Hypervariable regions (HV1 و HV2) والتي يتم تضخيمها بالـPCR، وهذا يُعطي معلومات حول تسلسل الموقعين 16,024 – 16,365 (≈ 342 bp) و 340 – 73 (≈ 268 bp) على التوالي. بعد ذلك يُقارن التسلسل المدروس مع معلومات تسلسلات الـmtDNA البشرية المُخزّنة في الكومبيوتر. إن المنطقة غير المشفّرة (تسمّى أيضاً منطقة السيطرة) تتغاير بحدود 1 – 3٪ بين الأفراد غير ذوي العلاقة، مع تغايرات تتوزّع على منطقتي HV1 و HV2.

لقد ساعد استعمال المعلومات حول تسلسل الـmtDNA في التعرّف على بقايا رفاة قديمة تعود لقيصر روسيا نيكولاس الثاني وعائلته. فقد وُجد في عام 1991 تسعة هياكل عظمية في قبر في مدينة Ekaterinburg في روسيا تعود للقيصر وزوجته (Tsarina Alexandra) وثلاث من بناتهم وثلاثة من الخدم وطبيب العائلة (Eugeny Votkin). وفي عام 1992 طلب علماء من المملكة المتحدة والولايات المتحدة إجراء بصمة الـDNA لهذه الهياكل التسعة.

لقد تم تحديد جنس تلك الهياكل من خلال تضخيم المواقع الجينية للـAmelogenin وقد عُزّزت هذه النتائج بالفحص العادي للعظام، وتبيّن بأن تلك البقايا تعود لأربعة ذكور وخمس بنات. هذا وقد أجريت أيضاً بصمة الـDNA للهياكل التسعة باستعمال خمسة مُعلّمات من الـSTR، وهي VWA/31 وF13A1 وThol

وFES/EPS وACTBP2، إذ أشار النمط الحزمي الأليلي إلى أن خمساً من الهياكل تعود للعائلة وتتضمن الأب والأم وثلاثة أطفال.

رابعا: مُعلمات الـDNA المتعددة الشكل المكبّرة عشوائيا (رابد) RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA Markers):

لقد حققت هذه التقنية بعض النجاح في دراسة البصمة الوراثية وذلك لسهولتها، إذ تتطلّب كميات قليلة من الـDNA، وعدم الحاجة إلى تعليم البوادئ المستعملة بالمواد المُشعّة كما في بعض التقنيات الأخرى. كما أنها غير مُكلفة وذلك لاستعمال بوادئ عشوائية (Arbitrary primers) رخيصة الثمن مقارنةً بالبوادئ المتخصصة (Specific primers) غالية الثمن. هذا فضلاً عن إمكانية إجرائها في مختبرات بسيطة، إلاّ أن استعمال هذه الطريقة في البصمة الوراثية لم يلقَ نجاحاً كبيراً وذلك لطبيعة البوادئ العشوائية، إذ لا يُعرف موقعها على الكروموسوم، إلاّ أنه يمكن استعمالها بالاشتراك مع بوادئ أخرى معروفة الموقع، وكذلك لا يمكن تمييز الأفراد الخليطة عن النقية للصفة، وهي من النقاط المهمة لتحديد طبيعة توريث الصفة، ولذلك تُعدُّ هذه التقنية من المُعلّمات السائدة (Dominant markers). ومن العيوب الأخرى في هذه التقنية هو عدم الثبات (Inconsistancy)، أي إمكانية عدم الحصول على النتائج نفسها عند تكرار التحليل (Repeatability) حتى على مستوى المختبر الواحد، إلاّ أن بعض الباحثين يُشير إلى إمكانية التغلّب على هذه المشكلة عن طريق استعمال الكميات المناسبة وبالتراكيز المطلوبة من المحاليل المختلفة المستعملة في العمل، وكذلك استعمال درجات حرارة مناسبة لكل بادئ على حِدة.

تُعطي طريقة RAPD أو ما يُلفظ رابد (Rapid) تحت الظروف الصحيحة نمط بصمة DNA متفردة لكل فرد، لذلك تستعمل في إثبات الشخصية. وتتضمن تضخيم طاقم من قطع DNA غير معلومة التسلسل. يتم خلط البادئ المُضخّم مع عينة الـDNA، وعليه فإن البادئ سوف يلتحم مع كل المواقع على عينة الـDNA التي تمتلك تزاوج قاعدي مع ذلك البادئ. ولبوادئ ذات طول 10 نيوكليوتيدات فإن الارتباط سوف يحدث في بضع آلاف من المواقع المنتشرة عشوائياً خلال الجينوم، وعندما ترتبط

البوادئ مع مواقع DNA تكون غير بعيدة جداً عن بعضها (ضمن ما يقارب 2000 نيوكليوتيدة)، فإنه يمكن أن يحدث تضخيم للـDNA بين تلك المواقع، وبالنهاية ينتج ملايين النسخ من تسلسل الـDNA يقع بين مواقع الارتباط. وعندما يتم فصل المنتج من مثل هكذا تفاعل بوساطة الترحيل الكهربائي على هُلام الأجاروز، فإن كل قطعة DNA مُضخّمة تظهر على شكل حزمة DNA مُميّزة. إن مواقع ارتباط البادئ في الجينوم لأي فردين من السكان تكون مختلفة بسبب الاختلافات الصغيرة في تسلسل الـDNA (مثل تغيرات القواعد، حالات الاندغام Insertions والحذف Deletions). وطالما أن ذلك يؤثّر على ارتباط البوادئ، فإن عدد ومواقع حزم الـDNA على الهُلام سوف يتغاير من فرد إلى آخر. إن نمط الـDNA الناتج يُعطي بصمة جديدة للـDNA، وهذا يمثّل لقطة فوتوغرافية (Snapshot) متميّزة لجينوم الفرد.

عندما يتم الحصول على نمط DNA لنسيج بيولوجي موجود في مسرح الجريمة ويُطابق المُشتبه به، فهذا ليس دليلاً أكيداً على أن النسيج يعود لهذا المُشتبه، ولكن يُستبعد كل الأطراف الذين يمتلكون نمطاً مختلفاً، لذلك فإن الستراتيجية المضبوطة هي بإنجاز خمسة أو أكثر من الأنماط من العينة نفسها باستعمال بوادئ مُضخّمة مختلفة، عندها نتحقق من كون هذا المُشتبه به هو المجرم الحقيقي، فإذا ما حدث بأن أنماطاً أكثر أعطت تطابقاً بين العينة والمُشتبه، فهذا يعني عدم احتمال كون العينة الموجودة في مسرح الجريمة قد أتت من شخص آخر غير المُشتبه به. إن احتمالية كون التوافق الكامل لكل أنماط التحزيم يحدث ببساطة بفرضية يمكن حسابها، فعلى سبيل المثال يمثل باحتمالية 1 في 100000 – 1 في 1000000 من التوافق العشوائي (Random match).

لقد استعملت هذه التقنية في دراسة الاختلافات (Polymorphisms) في الكثير من الكائنات الحية امتداداً من البكتريا إلى الإنسان، ولكنها استعملت بكثرة عند دراسة الأنواع النباتية وخصوصاً في برامج التربية النباتية، وذلك من أجل:

1. انتخاب الآباء المتباعدة للحصول على ما يُعرف بقوة الهجين (Hybrid vigour).
2. تقصير فترة برامج التربية التي قد تمتد لعدّة سنوات عند استعمال الطرق التقليدية.

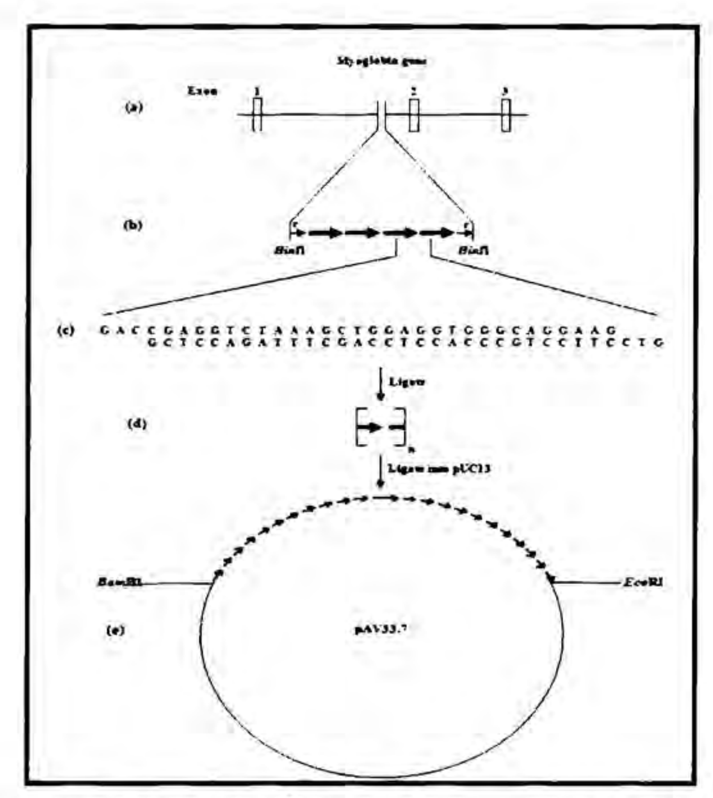
3. تحديد درجة النقاوة الوراثية للصنف الوراثي (Intracultivar variability).
4. تقليل عدد الأصول الوراثية التي يتعامل معها المُربّي ممّا يوفّر الجهد والمصاريف.

هذا وعلى الرغم من أن اغلب استعمالات هذه التقنية قد تركّزت في النواحي النباتية، ولكنها تحتاج إلى المزيد من الدراسة والتدقيق إذا ما أُريد لها النجاح والتطوّر في مجال بصمة الـDNA للنواحي العدلية.

ملاحظة: أحياناً يتم الاستفادة من الاعتماد على طريقة تحوير موقع القطع بالـPCR والتي تُسمّى PCR-mediated) PCR – MRSM method restriction site modification) في تطبيقات البصمة الوراثية كطريقة مُكمّلة للـPCRs، إذ يتم فيها إدخال موقع قطع صناعي في الجين الطافر من خلال إضافة طاقم من البوادئ، أحدها يكون طبيعي، وآخر فيها قاعدة خاطئة التزاوج القاعدي (Mismatched base). وبعد تضخيم عينة الـDNA بالـPCR فإن البادئ الحاوي على القاعدة ذات التزاوج الخاطئ ستُنتج أشرطة DNA تحتوي على طفرة نقطية (Point mutation) مجاورة، والتي تكون موقع قطع يُميّز الجين الطافر عن الطبيعي.

إحدى الستراتيجيات المُتّبعة من قبل جيفري لإنشاء مجس:

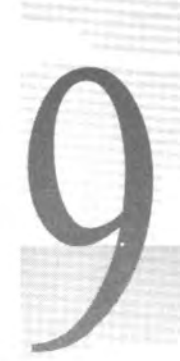
لقد قام جيفري وجماعته (1985) بتحضير مجس للـDNA المتغاير للإنسان، إذ تمّ إنشاء مجس متكرر من التوابع الكروموسومية الصغيرة لمايوجلوبين الإنسان (Human myoglobin minisatellites) بوساطة تنقية تسلسل مكوّن من 33 زوج قاعدي، يلي ذلك لصق رأس – ذيل وكلونة للبوليمر المتكوّن في بلازميد pUC13. إن قطع أي من التشكيلات المتكوّنة (المُسمّاة pAV33.7) بوساطة *Bam*HI مع *Eco*RI ينتج 767 زوج قاعدي من الـDNA يتضمّن أغلب المتكررات الـ23 السليمة من تسلسل 33 زوج قاعدي. إذ أثبت هذا المجس قدرة فائقة في تحديد صلاة القربى بين الوالدين وأطفالهم. والشكل (8 – 17) يوضّح ستراتيجية هذه الطريقة.



شكل (8 – 17). إنشاء مجس تهجين متكرر ترادفياً مكوّن من 33 زوج قاعدي (a و b)
إن هذا المجس قد اشتق من قطعة متكررة ترادفياً من جين مايوجلوبين الإنسان، إذ تقع هذه المنطقة في الأنترونة الأولى، وتتضمّن أربع متكررات من تسلسل ذو 33 زوج قاعدي، على جوانبها 9 أزواج قاعدية (r) قد تم عزلها في قطعة 169-bp *Hin*fI والتي تم إصلاح نهايتها وتضخيمها من خلال الكلونة في موقع *Sma*I للبلازميد pUC13 (c). إن الـ33bp المتكررة أمكن عزلها بوساطة قطع المتكررتين الثالثة والرابعة بالإنزيم *Ava*II (A)، وأجري استبدال قاعدة مفردة في المتكررتين 1 ، 2 لإزالة هذا الموقع، وإنشاء موقع للـ*Dde*I (D) بدلاً منه(d). يتم لحم القطع 33bp بوساطة نهايات لاصقة من نوع *Ava*II غير متماثلة لإنتاج بوليمر (متعدد) رأس – ذيل. إذ تحتوي هذه البوليمرات ما يساوي أو أكبر من 10 متكررات يمكن عزلها بوساطة الترحيل الكهربائي على هُلام الأجاروز، ويتم إصلاح النهايات واللصق في موقع *Sma*I للبلازميد pUC13 وتكلون في بكتريا *E. coli* JM83 (e). ويُلاحظ هنا في (e) أن البلازميد pAV33.7 يحتوي على 23 من المتكررات المكوّنة من أحاديات 33bp تقع ضمن قطعة 767 *Bam*HI / *Eco*RI.

الفصل التاسع

تطبيقات وأبعاد البصمة الجينية





الفصل التاسع

تطبيقات وأبعاد البصمة الجينية

بعض الاعتبارات الجنائية المُتعلّقة بالبصمة الجينية:

تدلُّ بصمات الأصابع التقليدية (الخطوط الجلدية) وبدقّة على مُتّهم ما، فيما إذا كان جانياً أم لا، شريطة وجود آثار لتلك البصمات في مسرح الجريمة، بحيث تُقارن تلك الآثار مع بصمة الشخص موضع الشك. وعليه فهي أداة للتعرّف على الشخص نفسه، في حين نجد أن البصمة الجينية تتخطّى هذه العلاقة الضيّقة، بحيث تُصبح دليلاً لإثبات النسب وصلات الرحم، الأمر الذي جعل منها وسيلة هامّة في حزم قضايا أكثر شمولية كالهجرة والمفقودين والقضايا الجنائية كالزنى والسفاح واللواط والاغتصاب والقتل، والقضايا المُسجّلة ضد الوسائل المستعملة من قبل المجرمين كالتضليل والتخفّي وخلط الدماء بدماء حيوانات أخرى ولبس القفّازات الواقية وقطع قنوات المني (Vasectomy) وإتلاف وتدمير جلد الأصابع... الخ.

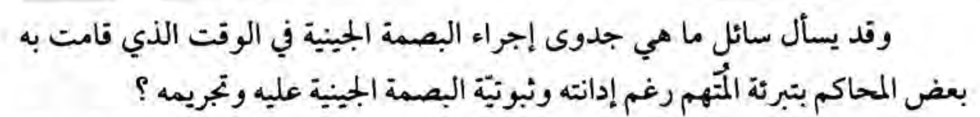
لقد كان المدعو كولين بيتشفورك (في عام 1986) أول مُجرم في بريطانيا تُدينهُ بصمته الوراثية، بعد أن قتل فتاة في الرابعة عشرة من العمر. ومنذ ذلك الحين تسابقت الشركات التجارية ومكاتب مكافحة الجريمة والتحقيقات الجنائية والشؤون الاجتماعية في تطوير كفاءة ودقّة بصمة الـDNA. فعلى سبيل المثال، اعتمد مكتب التحقيق الفيدرالي FBI (Federal Bureau of Investigation) على استعمال الإنزيم القاطع *Hae*III في الحصول على RFLPs، وذلك لكون هذا الإنزيم يُعطي أنماطاً ثابتة من حزم الـDNA، كما أنه لا يتأثّر بحدوث الميثلة في تسلسل الـDNA، وعليه يستبعد استعمال هذا الإنزيم الاختلافات الاصطناعية التي قد تنتج عن الميثلة المُتعمّدة للـDNA أو الميثلة الطبيعية في أنسجة مُعيّنة.

ومن المختبرات العالمية التي اكتسبت شهرةً واسعة في هذا المجال مختبر ReliaGene، نظراً للدقّة والثقة في الخدمات التي يُقدّمها لزبائنه على مستوى الأشخاص والمؤسسات أمام المحاكم المدنية والجنائية.

كما تتمتّع الشركة الكيمياوية العملاقة (The Giant Chemical Company) بفرعيها البريطاني ICI (Imperial Chemical Industries)، والأمريكي Cellmark بحقوق بيع وتوزيع بعض المُنتجات المُتعلّقة بالبصمة الوراثية، إذ يتوقّع المسؤولون فيها جني أرباح تُقدّر بملايين الدولارات خلال فترة وجيزة. هذا وتُعدُّ شركتي Lifecode Corporation في نيويورك و Forensic Science Association في كاليفورنيا من أهم الشركات المُنافسة للشركة أعلاه.

وبالفعل فإن التنافس في إجراء التحسينات على البصمة الجينية قد أعطى نتائج مُذهلة في القضايا الجنائية، ففي إحدى الحوادث التي أُحيلت من قبل قاضي التحقيق إلى مختبر البصمة الوراثية بسبب جريمة قتل حدثت بعد حادث اصطدام سيارتين انتهى بإطلاق النار من قبل أحد السائقين على الآخر، وهرب الجاني من الزجاجة الأمامية المُحطّمة، ولكن أثناء خروجه علق بعض الشعر والدم منه على حواف الزجاج الحادة، ومن المفارقات في هذه الجريمة أن القاتل كان قد سرق السيارة من صاحبها الأصلي. وقد اتُّهم صاحب السيارة بهذه الجريمة، ولكن إجراء البصمة الجينية بالاعتماد على الـDNA المُستخلص من الدم والشعر العالق على حواف الزجاجة الأمامية أثبت براءة صاحب السيارة.

هذا وتستطيع المرأة المُغتصبة في الولايات المتحدة الأمريكية وأوربا مثلاً، والتي هي في شك من أبويّة الجنين الذي في بطنها، هل يعود للمُغتصب الذي اعتدى عليها أم يعود للشريك الذي تُعاشره، من إجراء البصمة الجينية للجنين من خلال سحب عينة من السائل الأمنيوسي أو الزغّابات الكوريونية (راجع الفصل الثامن لمزيد من المعلومات)، ومقارنتها مع البصمة الجينية للشريك، وإذا ثبت كون الشريك ليس أباً لهذا الجنين، يُترك الخيار للأم في إبقائه أو إجهاضه.



وقد يسأل سائل ما هي جدوى إجراء البصمة الجينية في الوقت الذي قامت به بعض المحاكم بتبرئة المُتّهم رغم إدانته وثبوتيّة البصمة الجينية عليه وتجريمه ؟

وهنا نقول أن البصمة الجينية حالها حال غيرها من الأدوات العلمية التي قد يُساء استعمالها أو تفسيرها تحت معايير وأهواء وقناعات شخصية غير عادلة، كما حصل في قضية لاعب كرة القدم الأمريكية الأسود سمبسون (O. J. Simpson) الذي قتل زوجته في عام 1995 على اثر علاقتها مع شخص آخر، إذ أثبت اختبار البصمة الجينية للدم المأخوذ من سمبسون بأنه يتطابق مع البصمة الجينية للدم الموجود في مسرح الجريمة، ولكن محامي سمبسون كان يهدف إلى إبعاد هذا الدليل من قاعة المحكمة بحجّة إمكانية تطابق بصمتي DNA لشخصين بنسبة $\frac{1}{100000}$ وتحت معايير شخصية واعتبارات أخرى لهيئة المُحلّفين الذين كان غالبيتهم من السود، أُطلق سراح سمبسون رغم القناعة الأكيدة بكونه قد قتل زوجته. لقد كان قرارهم على ما يبدو كردّ فعل على ما جرى في حادثٍ سابق عندما قتل شرطة أمريكيين بيض رجلاً اسود!

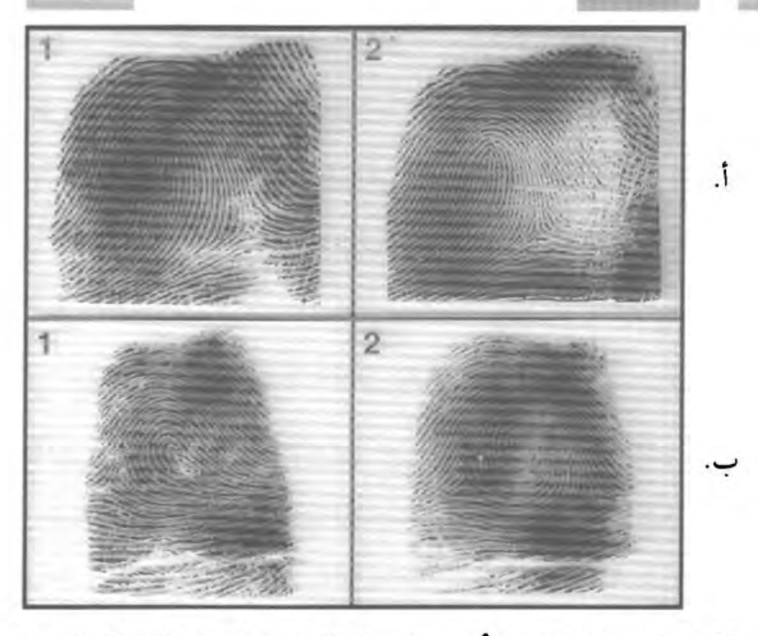
في الحوادث التي تشهد حرائق أو تفجيرات أو انهيارات مباني في الأماكن المُزدحمة أو تحطّم وسائل النقل كالطائرات والسيارات والبواخر ، أو الرفات التي يتم العثور عليها في المقابر الفردية أو الجماعية، فضلاً عن بقايا أو أشلاء الجثث المتخلّفة بسبب الحروب أو تلك الحوادث، نجد أن خبراء الطب الشرعي لا بُدَّ وأن يلجأوا إلى اختبار فحص الحامض النووي للتعرّف على هوية تلك الجثث، إذ لا مناص هنا عن هذه التقنية بسبب اختفاء المعالم المظهرية والوصفية للدلالات والعلامات الفارقة الخاصة بالموتى.

لذلك لا بُدَّ وأن تلجأ دول العالم النامية إلى تطوير كفاءات ومختبرات مُتخصّصة في هذا المجال لتسهيل وحل الكثير من المشاكل المُستعصية.

العلاقة بين الطرق التقليدية والبصمة الجينية في كشف الجريمة:

إن من نعم الله التي لا تُحصى، هو وجود الخطوط الجلدية (Dermal ridges)[*]، وخصوصاً تلك التي تتشكّل منها بصمات الأصابع (Fingerprints)، إذ ينطوي على وجودها فوائد عديدة، منها إحكام القبضة ومنع انزلاق الأشياء بعد مسكها باليد، من خلال زيادة قوة الاحتكاك مع تلك الخطوط، فضلاً عن إعجاز تفرّد أشكال البصمات في الأفراد بطريقة مُميّزة، وهي آية من آيات رُقي وكمال الخلق، حتى أن الله تعالى يذكر هذه القدرة الربّانية على إعادة شكل الخطوط الجلدية في بصمة البنان بدقّتها حين يبعثُ الخلق مرّةً أخرى بعد الموت ﴿ أَيَحْسَبُ ٱلْإِنسَٰنُ أَلَّن نَّجْمَعَ عِظَامَهُۥ ۝ بَلَىٰ قَٰدِرِينَ عَلَىٰٓ أَن نُّسَوِّيَ بَنَانَهُۥ ﴾[القيامة 3 – 4]، فمن البديهي في علم الخطوط الجلدية (Dermatoglyphics) عدم تطابق شخصين حتى التوائم الصنوية في بصمات الأصابع التقليدية، كما هو موضّح في الشكل (9 – 1)، إذ نلاحظ في الجزء (أ) من هذا الشكل تشابه نوع البصمة في التوائم الصنوية، وهي عروية كعبرية للتوأمين الصنويين، ولكن رغم هذا التشابه، فإن تفاصيل الخطوط الجلدية لبصمة التوأمين مختلفة، وهذه ميزة مهمة تتفرّد بها بصمة الخطوط الجلدية على بصمة الـDNA (شكل 9 – 2). ومن الممكن أن يزداد هذا الاختلاف بين التوائم غير الصنوية سواء في نوع البصمة أو تفاصيل الخطوط الجلدية (الجزء ب في الشكل 9 – 1).

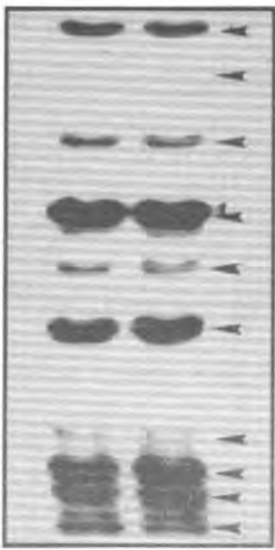
(*) ولمن يرغب بالإطلاع على الصفات الكمية (مثل TRC، ARC) والنوعية (أشكال البصمات) لهذه الخطوط في بصمات الأصابع وراحة اليد وأخمص القدم، فهنالك مصادر علمية كثيرة منها Cummins و Midlo (1976). ويُعدّ العالم العراقي أ. د. نصر فرحان عبد الله، أحد الباحثين البارزين في هذا المجال.



شكل (9 – 1). بصمة أصبع السبابة اليمنى (Right index finger)

أ. لتوائم صنوية (Identical twins): البصمة 1 و 2 عروية كعبرية (Radial loop).

ب. لتوائم غير صنوية (Non identical twins): البصمة 1 عروية زندية (Ulnar loop)، البصمة 2 مستديرة (Whorl).



شكل (9 – 2). تطابق بصمة الـDNA للتوائم الصنوية

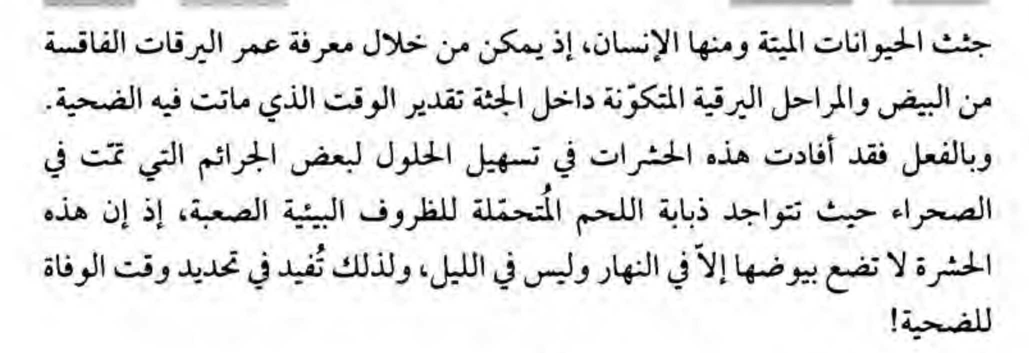
وتُعدُّ بصمات الأصابع دليل قوي جداً للإدانة، ولكن المشكلة هو عدم إمكانية الحصول دائماً على تلك البصمات من مسرح الجريمة، خصوصاً إذا لجأ المجرم إلى لبس القفازات أو مسح آثار البصمات من المناطق التي قام بلمسها أو أن تكون بصماته غير واضحة بشكلٍ كافٍ، لذلك في مثل هذه الحالة لا بُدَّ من اللجوء إلى البصمة الجينية كبديل موثوق لحل مشكلات كهذه. ولتوضيح كفاءة ودقّة هذه التقنية لنأخذ المثال الإحصائي الآتي: لنفترض أن بصمة الـDNA للفرد عبارة عن كلمة وردت في كتاب في الصفحات 16 و 48 و 123 و 200 فإنه من غير المحتمل أن يوجد كتاب آخر ترد فيه هذه الكلمة في تسلسل هذه الصفحات نفسها، إذ إن ضم احتمال الكلمات الأربع سيكون مُميّز للفرد، وهكذا الحال في بصمة الـDNA لعلامات (Markers) الـVNTR.
ولترسيخ هذه الفكرة أكثر لنأخذ مثالاً آخر حول أوراق لعب الكارته، فلو قسّمت 52 ورقة لعب إلى أربع مجاميع حسب النوع (13 ورقة لكل مجموعة) (كوبة، سنك، ماجه، دنر)، وتمّ سحب ورقة من كل مجموعة، وكانت الأوراق المسحوبة نوع: ملكة كوبة، ملك سنك، 2 ماجة، 6 دنر. إن احتمالية تطابق سحب أربعة أوراق مرة أخرى بهذه الكيفية نفسها لتكوين مثل هذه التشكيلة تكون شبه مستحيلة وتساوي $(\frac{1}{13})^4 = \frac{1}{28561}$. كذلك الأمر في كل علامة VNTR مُختارة لبصمة الـDNA، فإنها تحدث بتكرار قليل مُميّز في المجموعة السكانية، إذ إن ضرب الترددات لأربع علامات مختلفة يُعطي نموذجياً بصمة DNA بتردد يتراوح بين $\frac{1}{100000} - \frac{1}{1000000}$.

وفي إحدى حالات الاغتصاب استطاع فريق المحققين الحصول على السائل المنوي من الضحية، وتمّ إجراء بصمة الـDNA (عينة الدليل)، وقام رجال الشرطة بجمع المُشتبه بهم، وبوشر بإطلاق سراح كل متهم لم تتطابق بصمته الجينية مع عينة الدليل، ما عدا شخص واحد حدث له تطابق، عند التحقيق معه، أشار الخبير العدلي

إلى أن احتمالية التطابق مع شخص آخر هي بحدود 0.001٪ ($= \frac{1}{100000}$) في المجموعة السكانية. وعليه تعمل البصمة على استثناء 99.999٪ من المُشتبه بهم خارج دائرة الاتهام. وعند تطبيق هذا النموذج مثلاً على استراليا التي يبلغ عدد سكانها 4500000، فإن إمكانية التطابق = 45 فرد في كل استراليا ($\frac{4500000}{100000} = 45$)، ومن ثمّ إذا سكن فرد في قرية تعداد سكانها 3000، فإن تطابق بصمته الجينية مع شخص آخر تكون شبه معدومة.

لقد بدأ التطبيق الحقيقي الروتيني لبصمة الـDNA كأداة مهمة في الطب العدلي في عام 1988، إذ كان الفضل لهذه التقنية في تبرئة متهم أو إثبات جرمه، وأمكن تحقيق هوية أكثر من شخص بكفاءة عالية من خلال الإمكانيات ودقّة التمييز بين المجرم والبريء، ومن ثم فإنها تُعدّ وسيلة بديلة وناجعة لملء الثغرات التي مُنيت بها الأساليب التقليدية المُتبعة في التحقيقات الجنائية، وهنا لا نريد أن نُقلّل من شأن الوسائل القديمة، ولكن تلك الوسائل يمكن أن تحصر العدد إلى أقل ما يمكن، لتترك المجال لتقنية بصمة الـDNA للتعامل مع أقل عدد ممكن من المتهمين. وهنا لا بُدّ من الإشارة إلى الجريمة التي تمّت في عام 1987 عندما قام شاب بارتكاب جريمتي قتل، وكانت الضحيتان، وهما مراهقتان، قد اغتصبتا أيضاً، وقد تبيّن بأن الحيوانات المنوية التي أُخذت من الضحيتين تعود للشخص نفسه، وقد كان الاقتراح بأخذ عينة من الحيوانات المنوية من كافة الرجال المتواجدين في هذه المنطقة، أي من 3300 رجل وإجراء بصمة الـDNA، ولكن هذه العملية لا تخلو من الصعوبات، لذلك فقد ساعدت الطرق التقليدية في استبعاد 90٪ من هؤلاء وأصبح ممكناً تطبيق البصمة الجينية لما تبقّى منهم، أي 330 رجل فقط.

وهنا لا بُدَّ من القول إن البصمة الجينية وسيلة كغيرها يمكن أن تحتاج إلى طرق مُكمّلة أخرى لتحقيق الهدف ضمن إطار مُحدّد. فعلى الرغم من تطوّر الطب العدلي في مجال تحديد عمر الوفاة للضحية، قد تتطلّب الحاجة إلى تحديد الوقت الذي قُتلت فيه الضحية من خلال بعض الحشرات، مثل ذبابة اللحم التي تضع بيوضها في داخل



جثث الحيوانات الميتة ومنها الإنسان، إذ يمكن من خلال معرفة عمر اليرقات الفاقسة من البيض والمراحل اليرقية المتكوّنة داخل الجثة تقدير الوقت الذي ماتت فيه الضحية. وبالفعل فقد أفادت هذه الحشرات في تسهيل الحلول لبعض الجرائم التي تمّت في الصحراء حيث تتواجد ذبابة اللحم المُتحمّلة للظروف البيئية الصعبة، إذ إن هذه الحشرة لا تضع بيوضها إلاّ في النهار وليس في الليل، ولذلك تُفيد في تحديد وقت الوفاة للضحية!

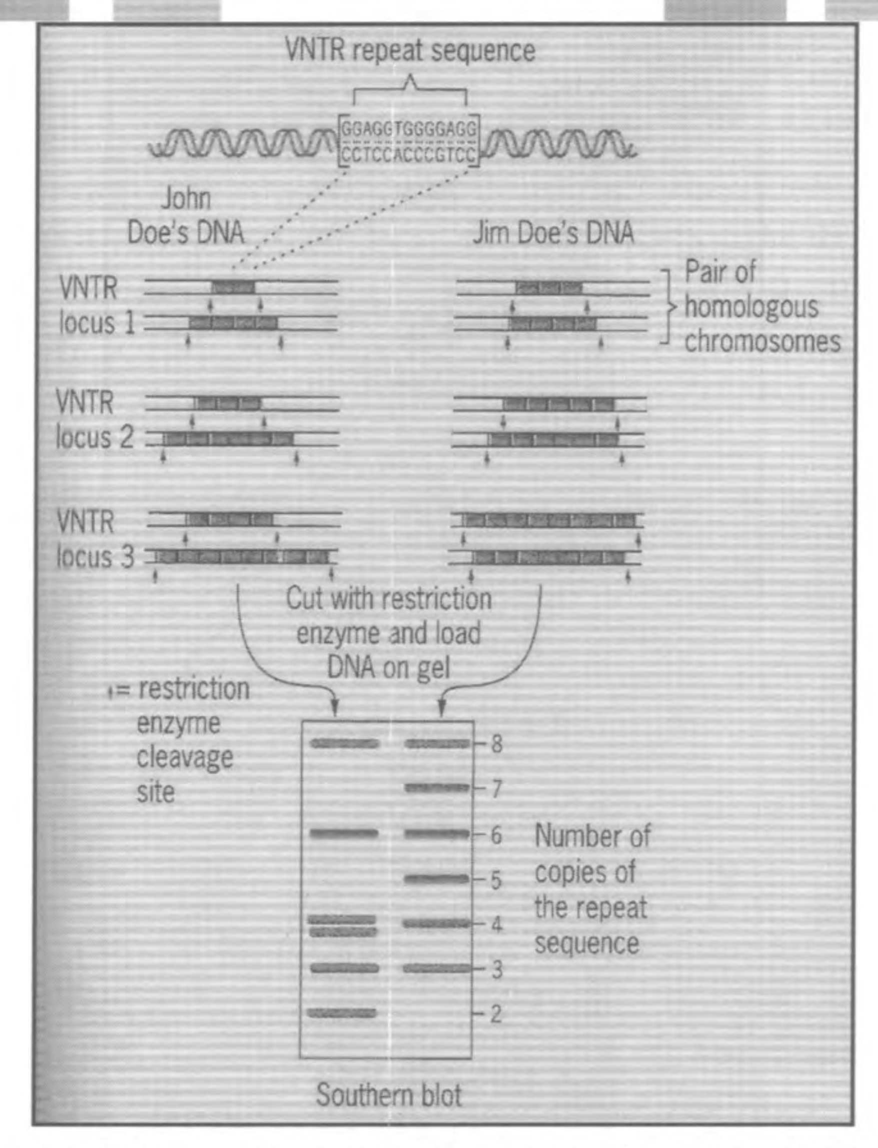
البصمة الجينية والقضايا العدلية:

بسبب العدد الكبير من التباينات في المادة الجينية للإنسان، فإن لكل منا هوية وراثية خاصة (مع استثناء التوائم الصنوية Identical twins)، لذلك فإن التباين الوراثي يمكن أن يستعمل لتحديد الأفراد بشكل أكثر دقّة من الاستعمال التقليدي لبصمات أصابع اليد، وطالما أن الـDNA يمكن أن يوجد في أي عينة بيولوجية كالدم والنُطف والشعر، كما يوجد أيضاً في الآثار التي تتركها بصمات الأصابع في مسرح الجريمة، ومن ثمّ يمكن الاعتماد عليها في كشف المجرم. إن هذا التباين الوراثي، وكما ذكرنا سابقاً، يمكن أن يزوّدنا بأدلّة مفيدة في التطبيقات العدلية، كإثبات الأبوّة والأمومة، والكشف عن هوية ضحايا الحوادث وقضايا الهجرة وغيرها. إذ إن استعمال الـVNTR والتوابع الكروموسومية الدقيقة (STRs) المتكررة على عدد من الأليلات مهم جداً في إعطاء بصمة DNA مُحدّدة خصوصاً وأن من أهم إيجابيات هذه التقنيات الفعّالة هي دقّتها العالية، فعند فحص صورة التباين للفرد المطلوب تكون احتمالية وجود شخص بالصورة نفسها قليلة جداً، فإذا كانت الأليلات في العينتين (العينة المأخوذة من مسرح الجريمة والعينة المأخوذة من المُشتبه به) متطابقة، فإن المُشتبه به لا شكّ يكون متورّطاً. إن الأسئلة التي تطرح نفسها هي حول إمكانية وجود شخص آخر في المجموعة السكانية العامة يمتلك الأليلات نفسها ليكون موضع شك أمام

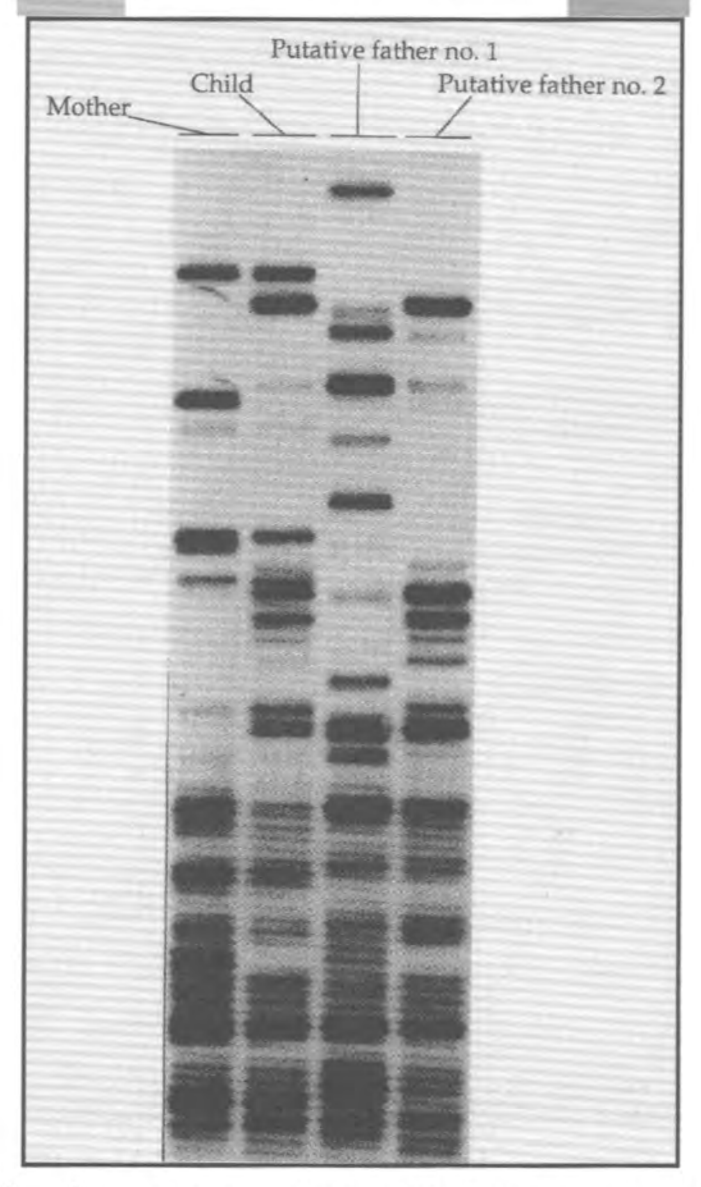
القاضي، وهل أن بصمة الـDNA تدلّ على الشخص الخطأ؟ في حالات الجرائم تكون إحتمالية الحصول على أليل يُطابق شخص عشوائي في السكان قابلة للحساب، خصوصاً وأن الدرجة العالية في التغاير الأليلي في الـVNTRs والـSTRs تفضي إلى احتمالية قليلة جداً لدرجة يمكن إهمالها. إن اعتماد طاقم من أربع مواقع للـVNTR تزوّدنا بشكل نموذجي باحتمالية تطابق عشوائي بحدود 1 لكل مليون. أما استعمال مواقع أخرى فإنه يختزل هذه الاحتمالية إلى أقل من ذلك بكثير، فعلى سبيل المثال إن استعمال عدد من مجسّات VNTR يزيد من دقّة العمل بشكلٍ مُلفت للنظر، فإذا كان تردد الموقع 1 يُحدّد في $\frac{1}{333}$ وتردد الموقع 2 يُحدّد في $\frac{1}{83}$ ، فإن مجموع تكرارهما يساوي ناتج ترددهما في الأفراد ويساوي $\frac{1}{28000}$ تقريباً، وطالما أن هذا التردد الكلي قد لا يخدم كدليل إثباتي، لذلك نحتاج لمواقع أخرى، فإذا كان تردد الموقع $3 = \frac{1}{100}$ وتردد الموقع $4 = \frac{1}{25}$ ، إذ يساوي مجموع ترددهما 2500، في حين إذا اعتمد التردد الكلي للمواقع الأربعة، فإن احتمال أن يمتلك فرد آخر التوافق نفسه من الأليلات هو 1 لكل 70 مليون فرد، أي بحدود 4 أفراد في كل سكان الولايات المتحدة الأمريكية، وهذا احتمال صعب التحقيق، إن لم يكن مستحيلاً، ولذلك تُصبح الدقة عند استعمال المواقع الأربعة عالية جداً. إن البصمة الجينية توفّر الدليل القاطع الذي يُمكّن رجل القضاء من إصدار الحكم العادل تحت مفاهيم تشخيص المتّهم علمياً، فإذا لم يتوفّر التطابق المفروض في هذه البصمة كان المتّهم بريئاً. فقد أشارت البحوث المبنية على التجربة العلمية إلى وجود ما يقرب حالة من ثلاث حالات اغتصاب، كانت بصمة الـDNA لديهم غير متطابقة مع عينة الإثبات، لذلك فإن هذه البصمة كانت مفيدة لأولئك الذي اتّهموا خطأً، إذ طلب قاضي التحقيق تحويل عينات النُطف المعزولة من مهبل الضحية إلى مختبر الهندسة الوراثية، ومُطابقة البصمة الجينية لها مع البصمة الجينية لعينة مأخوذة مباشرةً من المتّهم.

البصمة الجينية واختبار الأبوّة (Paternity test) أو ادّعاء النسب:

قديماً وفي حالة عدم التأكّد من أبوّة الطفل، يتم اللجوء إلى مقارنة فصائل الدم للطفل والأم والأب المُحتمل، ولكن فصائل الدم يمكن أن تستعمل هنا لإثبات كون الرجل ذو فصيلة الدم المعيّنة هو ليس أب الطفل، ولكن البصمة الجينية لا تستثني فقط الأب الغير حقيقي، وإنما تُعطي تشخيصاً موجباً للأب الحقيقي، إذ يتمّ إجراء البصمة الجينية لعينات الـDNA المُتحصّل عليها من خلايا الطفل والأم والأب المُحتمل، وعند مقارنة هذه البصمات لكل الحزم، فإن الحزم الموجودة في بصمة DNA الطفل يجب أن تكون موجودة في بصمتي الـDNA لوالدي الطفل، حيث إن لكلّ زوج من الكروموسومات المتناظرة، يستقبل الطفل أحد هذين الكروموسومين من الأب والثاني من الأم. ولذلك يكون نصف حزم DNA الطفل تقريباً ناتجة من تسلسلات DNA وُرثت من الأم، والنصف الآخر منها ناتجة من تسلسلات DNA وُرثت من الأب. ففي الشكل (9 - 3) مثلاً يُلاحظ وجود تسلسلات VNTR في ثلاثة مواقع كروموسومية، وبعد تطبيق بصمة الـDNA للأخوين Jim و John، أظهر Jim 6 حزم وهي (3 ، 4 ، 5 ، 6 ، 7 ، 8)، و John 5 حزم، (ملاحظة: الحزمة رقم 4 مُكرّرة، فتظهر كحزمة واحدة، ولكن للتوضيح رُسمت بشكل حزمتين متقاربتين)، وهي (2 ، 3 ، 4 ، 6 ، 8)، إذ تطابق الأخوان في 4 حزم، وهي (3 ، 4 ، 6 ، 8). وفي الشكل (9 - 4) تمّ إجراء بصمة الـDNA للأم والطفل والأبوين المزعومين المُشتبه بهما. في هذه القضية أثبتت البصمة الجينية بأن الأب المزعوم الثاني هو الأب الحقيقي للطفل. هذا ومن الجدير بالذكر هو إمكانية تواجد حزمة DNA في البصمة الجينية للطفل، وعدم تواجدها في البصمة الجينية للأب أو الأم، وهذا لا يعني أن هذا الطفل لا يعود لذلك الأب أو تلك الأم، إذ يمكن تفسير ذلك بحدوث طفرة وراثية (Mutation) أدّت إلى وجود تلك الحزمة المختلفة.



شكل (9 – 3). مخطط مُبسّط لاستعمال الـVNTRs في تحضير بصمات الـDNA



شكل (9 – 4). بصمات DNA للأم وطفلها ورجلين كل منهما يدّعي بأنه الأب

ولزيادة دقّة البصمة الجينية في تشخيص علاقات الوالدين – الأطفال، فإنه يُفضّل زيادة عدد المجسات المستعملة في التهجين الجزيئي، إذ إنه باستعمال مجسات أكثر يمكن الحصول على تنوّعات أكثر (Polymorphisms)، وكذلك يمكن مقارنة نسبة

عالية من الجينومات للوالدين والأطفال، وعند ذلك يتم الحصول على نتائج تشخيص أكثر منطقية.

طبقاً للوثائق التاريخية، فإن العائلة الملكية الروسية المُتمثّلة بالقيصر نيكولاس الثاني (Nicholas II) وزوجته الإمبراطورة سارينا الكساندرا (Tsarina Alexandra) وأطفالهم الخمسة: ألكسز (Alexis)، أولكا (Olga)، تاتيانا (Tatiana) ، ماري (Marie) ، أنستازيا (Anastasia)، (شكل 9 - 5)، قد أُعدموا بتاريخ 16 جولاي 1918 باطلاقات نارية من قبل جماعة أثناء الثورة البلشفية، ودُفنوا في قبر مُفرد في جبال الأورال.



شكل (9 – 5). أطفال القيصر نيكولاس الثاني: (من اليسار إلى اليمين) ماري، تاتيانا، أنستازيا، أولكا، ألكسز

وفي عام 1920 تم انتشال امرأة اسمها فراولين (Fraulein Unbekannt) (أو آنا Anna Anderson Manahan كما عُرفت بعد ذلك)، من إحدى قنوات المياه وهي بحالة برودة مُفرطة، وقد ادّعت بأنها الدوقة أنستازيا رغم أنها لم تكن تتكلّم الروسية. إن فراولين كانت مشدوهة البال بخصوص تفاصيل حياة البلاط الروسي الملكي، وادّعاءها بأنها أنستازيا قد جوبه برفضٍ شديد من قبل أقارب العائلة الملكية الروسية.

لذلك قام الغرنادوق المسؤول عن مدينة Hesse باستئجار مُتحرّي خاص للتحرّي عن أصل آنا، وهل أن ما تدّعيه صحيح أم لا؟ لقد استنتج المُتحرّي بأن آنا هي في الواقع فرانزيسكا (Franzisca Schanzkowska)، ولكن الجدل بقي مستمراً. وعلى الرغم من أن القليل معروف عن فرانزيسكا، فهي وُلدت في الجزء الشمالي من ألمانيا، وعاشت في برلين خلال الحرب العالمية الأولى، وتعرّضت لإصابة خطيرة نتيجة لانفجار في معمل الذخيرة الذي كانت تعمل فيه. بعد ذلك تمّ إدخالها في مصحتين عقليتين للعلاج، ثمّ اختفت في عام 1920 في الوقت نفسه الذي تمّ فيه إنقاذ آنا من القناة في برلين وادّعت بأنها أنستازيا.

وبهدف الوصول إلى الحقيقة تمّ إقناع عمة أنستازيا البرنسيسة آيرين (Irene) بمقابلة المرأة التي ادّعت بأنها ابنة أخيها، فهربت آنا وأخفت نفسها في غرفتها. إن تصرّف آنا الغريب جعل من ادّعائها بأن تكون أنستازيا صعب التحقق منه، لذلك استمر الجدل حول شخصية آنا لمدة 70 سنة. هل كانت آنا فعلاً هي أنستازيا أم لا؟ إن المساندين لها مُصرّين على هذا الاعتقاد، وأنها فعلاً هي الدوقة، أما الغير مُصدّقين فقد استمروا على تأكيدهم بأنها ليست أنستازيا.

في عام 1979 اكتشف جيولوجي روسي قبر غير عميق يُعتقد بأنه يحتوي على بقايا رفات العائلة المالكة، وبسبب المناخ السياسي في الاتحاد السوفيتي في ذلك الوقت، قام هذا الجيولوجي بإعادة دفن الرفات. وبعد 12 سنة وعندما أصبح المناخ السياسي مناسباً، تمّ استخراج رفات الجثث والتحقق منها بوساطة مقارنة البصمة الجينية للـDNA المُستخلص من الهياكل العظمية مع البصمة الجينية للأقارب الباقين على قيد الحياة، إذ تم إعادة النظر في الجدل حول شخصية آنا، وذلك بسبب اختفاء رفات جثتين، وهما جثة أنستازيا وأخيها ألكسز. والسؤال المطروح هل تمكّنوا من الهرب من الإعدام أم ماذا؟ وعلى الرغم من عدم وجود إجابة حتمية لهذا السؤال حتى الآن، إلاّ أن نتائج بصمة الـDNA تدلّ على أن آنا هي ليست الدوقة أنستازيا.

لقد توفيت آنا في عام 1948 بعمر يناهز 83 سنة، ولكن خلال عملية أُجريت لها في عام 1979 في مستشفى Martha Jefferson في مدينة Charlottesville ولاية

Virginia، تمّ إزالة نسيج من الأمعاء وتثبيته بالفورملديهايد وحفظه في كتلة من شمع البرافين، وكذلك تم حفظ عدد قليل من بصيلات شعر آنا. وعليه أمكن إجراء اختبارات الـDNA التي تضمّنت دراسة تسلسلات الـVNTR والتسلسل النيوكليوتيدي للمناطق الغير مُشفّرة لـDNA المايتوكوندريا لنسيج الأمعاء وبُصيلات الشعر المحفوظة، وكذلك على عينات DNA دم أقرباء فرانزيسكا والعائلة الملكية. إن هذه الاختبارات أُجريت باستقلالية تامّة في ثلاثة مختبرات مختلفة، وهي:

1. مختبر تشخيص الـDNA للقوات المسلحة في الولايات المتحدة.

2. مختبر خدمات العلوم الجنائية في بريطانيا.

3. مختبر قسم الأنثروبولوجي في جامعة بنسلفينيا.

لقد دلّت النتائج التي تمّ الحصول عليها من هذه المختبرات الثلاثة على أن آنا لم تكن هي أنستازيا، وفي حقيقة الأمر أثبتت بقوة أن آنا كانت فرانزيسكا. ومن خمس VNTRs مختلفة تمّ فحصها، لوحظ بأن أربع منها لم تكن متوافقة مع احتمالية كون آنا هي ابنة القيصر نيكولاس الثاني. كذلك أثبتت عملية مقارنة تسلسل الـDNA بأن آنا لم تكن لها صلة قرابة مع العائلة المالكة، وبدلاً من ذلك أكّدت معلومات التسلسل النيوكليوتيدي على أن آنا كانت هي فرانزيسكا، وعند المواقع الستة المتغايرة الموضّحة في الجدول (9 – 1) لـDNA المايتوكوندريا، يُلاحظ احتواء هذا الـDNA على النيوكليوتيدات نفسها الموجودة في DNA كارل ماوتشر (Carl Maucher) وهو ابن ابن أخت فرانزيسكا، واختلف عن التسلسل الموجود في DNA دوق مدينة أدنبرة وهو ابن ابن أخت سارينا الكساندرا. وهكذا ساهمت البصمة الجينية في إماطة اللثام وحل لغز مُعقّد لقصة مثيرة كهذه القصة.

جدول (9 – 1). النيوكليوتيدات المُتغايرة في DNA المايتوكوندريا

الموقع:	1	2	3	4	5	6
Anna Anderson Manahan (آنا)	C	C	T	T	C	T
Carl Maucher (ابن ابن أخت فرانزيسكا)	C	C	T	T	C	T
(ابن ابن أخت الكساندرا) دوق أدنبرة	T	T	C	C	T	C

وفي عام 1989 عُثر على بقايا هيكل بشري في إحدى الغابات في الولايات المتحدة الأمريكية، إذ تمّ استخلاص الـDNA من الخلايا العظمية للهيكل، وقورن مع الأدلّة المقدّمة من أهالي الأطفال المفقودين، وتبيّن من خلال تحليل البصمة الوراثية بأن الهيكل يعود لطفلة مفقودة منذ سنوات.

كما تمكّن الأطباء الشرعيون في عام 1992 من تحديد الهوية الوراثية لقائد عسكري مفقود منذ الحرب العالمية الثانية، من خلال عثورهم على بعض الهياكل البشرية أثناء جرف أرض المعسكر في إحدى الولايات المتحدة الأمريكية، إذ أمكن التعرّف على هذا القائد من خلال أخذ عينات دم من والدته وأولاده، ومقارنة بصمة الـDNA لتلك العينات مع بصمة الهياكل العظمية المعثور عليها.

تطبيقات البصمة الجينية في الكائنات الأخرى:

تُعدّ البصمة الجينية أداة بحثية قوية يمكن استعمالها للكائنات الأخرى، مثل القطط والكلاب والطيور والنباتات والكائنات الدقيقة وغيرها، كما أنه من الممكن استعمالها في مجال حل المشاكل البيئية التي دُرست سابقاً بالطرق التقليدية، ومن المتوقّع أن يتّسع استعمال علم البيئة الجزيئي ويكون له تأثير هام في دراسة الكائنات تحت الظروف البيئية المختلفة.

في عام 1980 تمكّن Singh وجماعته من عزل DNA التوابع الكروموسومية الحاوية على التسلسلات المتكررة GATA و GACA والمُسمّاة BKm sequences من إناث أفاعي الكريت المُحزّمة (Banded krait snake)، والتي استعملت كمجسات في تقنية الـRFLPs لتحديد الجنس في كثير من الحيوانات كالطيور، لقابليتها على التهجين مع تسلسلات كروموسوم W، وحشرة ذبابة الفاكهة، لقابليتها على التهجين مع كروموسوم X، والفئران، لقابليتها على التهجين مع كروموسوم Y. كما استعملت في تحقيق بصمة الـDNA لبعض أنواع الأسماك، وذلك لقابليتها على التهجين مع بعض تسلسلات الكروموسومات الجسمية فقط وبصورة مُتغايرة.

كما كان لتطبيق بصمة الـDNA دوراً فعّالاً في الدراسات التصنيفية للمراتب التصنيفية المختلفة والتطورية للكائنات الحية المتنوّعة، الأمر الذي انبثق عنه ما يُسمّى

بعلم التطور الجزيئي (Molecular evolution). فقد استعمل مثلاً المجس المُحضَّر من قبل جيفري وجماعته (1985) في التهجين مع DNA مايتوكوندريا الحيتان، واثبت كفاءة عالية في التمييز بين أفراد النوع الواحد، لذلك فقد استعملت تقنية الـRFLPs في دراسة حياتية هذه الحيوانات وعلاقاتها التطورية، فضلاً عن متابعة هجرتها. وقد استعملت البصمة الجينية في دراسة العلاقة التطورية بين الفيل الحديث والماموث المكسو بالصوف الذي كان يعيش في أمريكا الشمالية وآسيا وأوروبا قبل آلاف من السنين الماضية. فقبل بضع سنوات تمّ العثور على صغير ماموث مات منذ 40000 سنة مضت وتجمّد في سيبيريا، إذ حُفظت أنسجته بشكلٍ جيد في الثلج، الأمر الذي مكّن من استخلاص الـDNA وإجراء البصمة الجينية للماموث ومقارنتها مع البصمة الجينية للفيل الحديث، وبالفعل أُثبتت العلاقة التطورية بينهما.

ولا يخفى على القارئ تطبيقات البصمة الجينية في مجالات الإنتاج الحيواني والنباتي من ناحية تمييز الضروب والأنواع والأجناس المُتميّزة في صفة إنتاجية مُعيّنة، كإنتاج البيض أو الحليب أو اللحم أو بروتين نباتي مُعيّن، فضلاً عن دراسة وتطبيق الهجن والأصناف النباتية في أعمار مُبكّرة أو متقدّمة.

أمثلة على حوادث طُبّقت فيها البصمة الجينية في كشف أسرار الجريمة:

اعتدى شخص عام 1989 في الولايات المتحدة الأمريكية على فتاة اسمها لوسي، بعد أن وضع عصابة قماش على عينيها، ولم ترَ وجهه، وقام باختطافها من غرفة نومها ذات الشباك القريب من الشارع. وعندما حضر الشرطة وجدوا بالقرب من سرير نوم الفتاة محفظة رجالية تخص الشاب مايكل جيرو، وهو مصور أعراس مُحترف، ويُعرف عنه اللطف والأخلاق المُهذّبة، وقد قام سلفاً بإبلاغ الشرطة بأن محفظته قد سُرقت. وبعد التحقيق اعترف بأنه اغتصب لوسي، وقال بأنها المرة الأولى التي يقوم فيها بعملٍ كهذا عندما مرَّ في الشارع ونظر من الشباك ورأى فتاة عارية راقدة في فراشها. وقد حُكم عليه بالسجن لفترة قصيرة، وخلال فترة السجن قام ببيع منزله، إذ وجد النزلاء الجدد محفظة غريبة مُخبأة في الطابق السفلي، فيها وثائق تُثير الريبة والشك، لذلك قاموا بتسليمها للشرطة. قام المحقق المُكلّف بمتابعة المعلومات المذكورة في تلك الوثائق،

بمتابعة الأسماء المُدوّنة في المحفظة، ومن تلك الأسماء الفتاة لوسي. لقد أخبرت لوسي المحقق بأن شخصاً اعتدى عليها جنسياً بعد أن هدّدها بمقص ووضع عصابة على عينيها وهمس في أذنها بأنه سوف لن يؤذيها إذا أذعنت له، وبعد الاعتداء أجبرها على الاستحمام.

لقد كان مايكل جيرو يسكن في هاي بارك من الفترة 1983 - 1986 مع صديقته آني. وفي عام 1990 حدثت جريمة اعتداء جنسية على مربية فرنسية في هاي بارك أيضاً. ومع أواخر عام 1992 تزايدت الشكوك حول مايكل جيرو بأنه هو المسؤول عن اعتداءات هاي بارك، وبعد إطلاق سراحه وُضع تحت المراقبة، إذ لوحظ بأنه يعيش حياة طبيعية ويبحث عن عمل. وخلال ذلك تابعت الشرطة التحقيقات حول الاعتداءات السابقة في هاي بارك، خصوصاً وأن الفتيات اللواتي أُعتدي عليهن جنسياً ذكرن الرواية والأسلوب نفسهما: توضع على أعينهن عصابة ويتم اغتصابهن، ثمّ يُجبرن على الاستحمام لإزالة أي أثر للسوائل البيولوجية.

وفي عام 1993 تمّ تأسيس مختبر لإجراء بصمة الـDNA، وممّا شجّع ذلك المبدأ القائل بأنه لا يمتلك أي شخصان الحامض النووي ذاته باستثناء التوائم الصنوية.

المهم في هذا الأمر بأن الشرطة قامت باعتقال مايكل جيرو مرّةً أخرى وربطه على جهاز كاشف كمحاولة لكشف الجريمة، وأثناء عرض مشاهد لحالات اغتصاب مُعيّنة، لوحظ بأنه يرتبك بشدّة، ومن خلال السجلات التي تتعلّق به، تبيّن بأنه يسترق النظر من فتحات الأبواب والشبابيك، كما تبيّن بأنه سبق وأن شوهد في مجمّع هاي رايز الذي حدثت فيه حوادث كسر للأبواب. كما أن صديقة مايكل جيرو أخبرت المحققين بأنها عثرت في منزله على حقيبة تحتوي صور لنساء عاريات بعد أن تمّ ربطهنّ بالحبال، وذكرت بأنها تشاجرت معه بسبب تلك الصور. لقد حصل المحققون على مذكرة تسمح بتفتيش غرفة مايكل جيرو، إذ كانت الغرفة بأبعاد 10 × 12 قدم، وعثر فيها المحققون على خزانة فيها حقيبة تحتوي على صور خليعة وأشرطة فيديو ودفتري ملاحظات مُدوّن فيهما 33 حالة اغتصاب.

قامت الشرطة بإحضار الأدلة المُحتفظ بها لتلك الـ33 حادثة، سواء من السراويل المُلطّخة بالسائل المنوي أو من عينات اللعاب، واستخلاص ومطابقة الـDNA مع DNA مايكل جيرو، إذ أظهرت نتائج الفحص تطابق بصمة DNA مايكل جيرو مع 4 من العينات الـ15 الصالحة للتحليل (من ضمن 33 عينة)، لذلك اعترف بأنه كان من الساعة 7 مساءً حتى الفجر يقوم بمراقبة الشبابيك، ثمّ يُخطّط للجريمة وينفّذها، ويُجبر النساء على الاغتسال. وقد حُكم عليه بالسجن لمدة 25 عاماً.

وفي عام 1995 وقعت حادثة اعتداء جنسي في داخل نفق بالقرب من أحد المتنزّهات في مدينة تورنتو بعد دخول إحدى الفتيات واسمها سنيتا إلى هذا النفق، ولم تتمكّن الشرطة إلاّ من أخذ لُعاب المجرم الناجم عن تقبيله للفتاة، إذ أُرسل إلى المختبر لاستخلاص الـDNA منه وإكثاره بالـPCR. وبعد فترة تكرر الحادث من قبل المجرم نفسه وفي المكان نفسه، على ضحية أخرى اسمها مري آن، إذ تمّ جمع السائل المنوي للمجرم من جسم مري آن وإرساله إلى المختبر أيضاً. وقد بيّنت النتائج تطابق بصمتي الـDNA لعيّنتي اللعاب والحيوانات المنوية، وأنهما تعودان للشخص المُعتدي نفسه. وعليه توجّه الشك نحو شاب أسود عمره في أواخر العشرينيات، نشاطه محدود في تلك المنطقة الجغرافية الضيّقة.

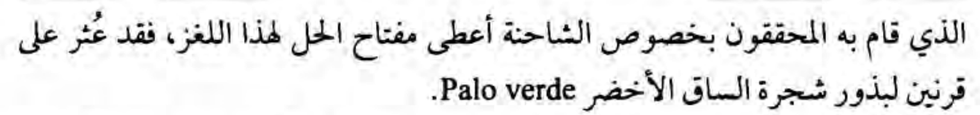
طلبت الشرطة من الفتاتين مساعدة المُتخصّص برسم الصور على الأوصاف بعد أن قامت الفتاتين بوصف شكل الجبهة والحواجب والعيون والأذنين والشعر (أو أي جزء بارز من الوجه)، إذ تُجمّع الصورة فيما بعد على جهاز كومبيوتر، ويتم من خلال برنامج خاص بالكومبيوتر وضع حاجز مثل المنديل على الصورة لمُحاكاة الحقيقة، ثمّ يُطلب من الضحيتين الشاهدتين المقارنة. ولكن المشكلة هنا مع من تتم مطابقة بصمة الـDNA، إذ لا يوجد مصدر مُشتبه به للمطابقة إلى بعد القبض على المُشتبه بهم للتأكّد.

بعد يومين من وقوع حادث الفتاة مري آن تمّ إلقاء القبض على مراهق أسود اسمه فرانك سويني له المواصفات نفسها، وقد ادّعى بأنّه بريء. وبعد اختباره باستعمال جهاز كشف الكذب أخفق في الفحص بعد 10 ساعات من الاستجواب، واعترف باقترافه لتلك الجريمتين، ولكنه أنكر ذلك بعد الاجتماع بالمحامي.

لذلك تمّ أخذ عيّنة دم منه، وطُلب من عالمة الأحياء كيم جونستن تحليل بصمة الـDNA له. وبعد أيام قالت كيم جونستن بأنّه ليس هو المجرم، وعليه أُطلق سراحه، وعادت التحقيقات من جديد، وتمّ نشر قوات لتمشيط المنطقة حول المتنزّه، وقد باءت تلك المحاولات بالفشل الذريع.

وفي منطقة أخرى قريبة، كانت امرأة عائدة من محطة باص وقام رجل بإمساكها من الخلف وتسليط سكينة على عنقها، ولكن أحد الجيران شاهد ذلك المنظر، واضطر المجرم إلى الهرب. لذلك تعقّدت المشكلة أكثر، لأن المجرم يقوم بتغيير المناطق التي يُزاول فيها نشاطه. وبعد أسبوعين حصل هجوم آخر على فتاة في المتنزّه القديم، وبعد 6 أشهر تلقّت الشرطة اتصال هاتفي من امرأة تعرّضت لاعتداء اسمها جبرييل بعد أن أرسلت إشارة إلى خارج المنزل للسائق الخاص بها، فدخل السائق وقبض على المُعتدي المسمّى لويس الذي قام بالإنكار. أطلقت الشرطة سراحه وبوشر بمراقبته من قبل المحققين، وطلبوا منه أخذ عينة دم لفحص الـDNA فرفض ذلك، الأمر الذي اضطرّهم لتفتيش منزله، إذ وُجدت مذكرات فيها خطط للاعتداء على النساء، كما وجدوا خرائط لمواقع تلك الاعتداءات. وبعد أخذ عينة دم منه وإرسالها إلى المختبر، أثبتت عالمة الأحياء كيم جونستن بعد يومين تطابق بصمة الـDNA هذه مع بصمة الـDNA للأدلة المتوفرة من الاعتداءين الذين تمّا في المتنزّه. لذلك اعترف المجرم بتلك الاعتداءات وحُكم عليه بالسجن 10 سنوات، ولكنه لم يعتذر عن تلك الجرائم!

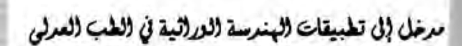
كما وأود الإشارة هنا إلى حادثة طريفة، سُمّيت شجرة الساق الأخضر المُبلّغ (الواشي)، وهي واحدة من الأحداث الجنائية المثيرة لاستعمال بصمة الـDNA، إذ لم تتضمّن هذه الحادثة DNA المُشتبه به وإنما DNA نباتات تنمو في موقع الجريمة. ففي مساء الثاني من شهر مايو لسنة 1992 خُنقت امرأة من منطقة **Phoenix** وأُخفيت جثّتها بالقرب من مصنع مهجور. وقد عثر المحققون على جهاز مناداة بالقرب من الجثة، وهذا يجعل من صاحبه المُشتبه به الأولي في هذه الجريمة. وعندما استجوبوا الرجل اعترف بأنه كان مع المرأة في اليوم الذي وقعت فيه الجريمة، وادّعى أن ذلك لم يكن بالقرب من المصنع، وأن المرأة يجب أن تكون قد سرقت الجهاز من الشاحنة. إن البحث

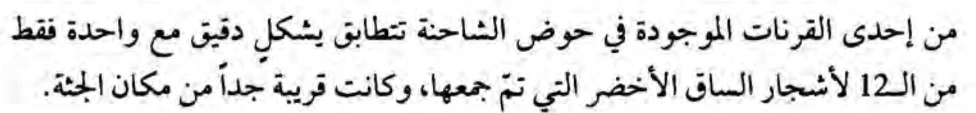


الذي قام به المحققون بخصوص الشاحنة أعطى مفتاح الحل لهذا اللغز، فقد عُثر على قرنين لبذور شجرة الساق الأخضر Palo verde.

تنمو شجرة Palo verde (*Cercidium floridum*) بشكل طبيعي في الأراضي الجنوبية الغربية، وتعود لعائلة الفاصوليا، ومن أجل تكيّفها مع الظروف البيئية الحارة والجافة تُكوّن أوراقاً صغيرة جداً. وللتعويض عن كمية الكلوروفيل المحدودة في الأوراق الصغيرة هذه تُصبح سيقانها خضراء، وتقوم بالتركيب الضوئي. وهذا يُعطي النبات اسم Palo verde والذي يعني بالأسبانية الساق الأخضر. إن هذه الشجرة لا تُشابه نبات الفاصوليا في بعض النواحي، ولكنها كأي نبات فاصوليا نموذجي تُكوّن بذور ضمن قرون تسقط على الأرض عند نضجها.

تساءل المحققون عن إمكانية إثبات كون قرون البذور الموجودة في حوض شاحنة المُشتبه به قد سقطت من أشجار الساق والأخضر في المكان الذي وُجدت فيه الجثة، فإذا كان كذلك فإنه سيكون الدليل حول مكان المُشتبه به من موقع الجريمة. ولكن كيف يتم تحقيق ذلك؟ استعان المحققون بالدكتور Timothy Helentjaris في جامعة أريزونا، إذ قام بتحديد إمكانية تطابق الـDNA للبذور من حوض الشاحنة مع أي من أشجار الساق الأخضر بالقرب من مكان الجريمة، إذ عدّ هذا التطابق من الأهمية، لذلك عليه أولاً أن يُبيّن أن نبات الساق الأخضر يختلف وراثياً عن غيره من الأشجار القريبة، والا سوف لا تكون البذور كدليل لهذه الشجرة بحدِّ ذاتها. ولحسن الحظ وجد تغايراً كبيراً في نمط الـDNA بين أشجار الساق الأخضر. لقد أخذ Helentjaris قرني البذور من شاحنة المتهم وقارنها مع بذور قرون من 12 شجرة ساق أخضر جُمعت من جوار المصنع، إذ إن المحققين يعرفون أي من الـ12 شجرة هي المفتاح، والتي تمثّل موقع الجريمة، ولكنهم لم يُخبروا الدكتور Helentjaris بذلك، والذي قام باستخلاص الـDNA من البذور لكل قرن، وتمّ تطبيق تقنية RAPD باستعمال بادئ مُضخّم يُعطي بحدود 10 – 15 حزمة DNA مُميّزة، إذ إن نتائج هذه التجربة المُتحكّم بها غير قابلة للخطأ. أظهرت النتائج بأن صورة الـDNA





من إحدى القرنات الموجودة في حوض الشاحنة تتطابق بشكلٍ دقيق مع واحدة فقط من الـ12 لأشجار الساق الأخضر التي تمّ جمعها، وكانت قريبة جداً من مكان الجثة.

وفي اختبار إضافي آخر مهم، أثبت Helentjaris بأن صورة الـDNA هذه تختلف عن قرنات جُمعت من 18 شجرة أخرى تقع في مكاناتٍ عشوائية حول منطقة Phoenix. إن تحليل كل العينات أفضى إلى تقدير احتمالية التطابق العشوائي لأقل من 1 في 1000000، وهي نسبة ممتازة وعلى درجة عالية من الدقّة.

لقد قُدّمت هذه النتائج كدليل إدانة قوي في المحكمة حول مكان المُشتبه به في مسرح الجريمة. وبعد انتهاء 5 أسابيع من المحاكمة، كانت قد وُجّهت إلى المُشتبه به تهمة القتل كمجرم من الدرجة الأولى، وأُدين بعد استئنافه للحكم، وحالياً يقضي عقوبته في السجن مدى الحياة.

الفصل العاشر

الضوابط القانونية وبناء البنوك المعلوماتية للبصمة الجينية



الفصل العاشر

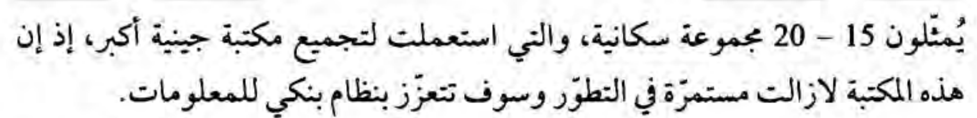
الضوابط القانونية وبناء البنوك المعلوماتية للبصمة الجينية

هنالك بعض الضوابط والشروط يجب أن تخضع لها البصمة الجينية بهدف تطبيقها، إذ لا بُدَّ وأن تخضع البصمة إلى معايير فراي كيلي (Frye Kelly standards)، وتشترط هذه المعايير ما يأتي:

1. أن يكون الأسلوب العلمي الحديث مقبولاً لدى الأوساط العلمية المختلفة، وأن تكون صلاحيته التجريبية قد أُثبتت قبل إدخاله في حيّز القضاء.
2. ارتباط هذا الأسلوب العلمي الحديث مباشرةً بالقضية بحيث يستند إليه رجال القانون في مُرافعاتهم دون التعدّي على الحقوق الشخصية. فالمعلومات ذات الصلة بالبصمة الجينية يمكن حفظها واسترجاعها عند الحاجة، لذلك لا بُدَّ من وجود ضمانات لعدم إساءة استعمال هذه المعلومات المأخوذة من الأشخاص المُختبرين لأغراض لا تتعلّق بالقضية تحت المداولة. لذلك يقترح دُعاة الدفاع عن حقوق الإنسان إتلاف العينات والمعلومات بعد استيفاء الهدف الرئيسي منها، أو تخزينها بحيث لا يُسمح لغير المُخوّلين الإطّلاع عليها.

بسبب دقّة البصمة الجينية، فإن مكتب التحقيق الفيدرالي FBI أسس بنوك للبصمات الجينية اعتمدت على 3 – 4 تغايرات قد تمّ تحديدها في المجاميع الأثنية التي أعطت بصمات DNA مُميّزة مقارنةً مع بصمات DNA لأفراد غير مُحدّدي العرقية، وقد تمثّلت هذه المجاميع الأثنية بالسود (Black) والقوقازيين (Caucasian) والهسبانك (Hispanic قاطني أمريكا اللاتينية).

ونتيجةً للتغاير المُلاحظ في عروق إضافية أخرى، فإن الأكاديمية الوطنية للعلوم (National Academy of Sciences) قد أوصت بإجراء البصمة الجينية لـ100 فرد



يُمثّلون 15 - 20 مجموعة سكانية، والتي استعملت لتجميع مكتبة جينية أكبر، إذ إن هذه المكتبة لازالت مستمرّة في التطوّر وسوف تتعزّز بنظام بنكي للمعلومات.

فضلاً عن ذلك فقد بوشر بتنفيذ تشريعات في 26 ولاية أمريكية للسماح بجمع عيّنات الدم وأحياناً اللعاب، وكذلك بصمات الأصابع وبصمات الإبهام (Thumbprints) لتشخيص المساجين، إذ يتم إدخال بصمة الـDNA لكل سجين في نبك المعلومات، وقد بوشر بتوحيد استعمال طاقم من المجسات والإنزيمات في دراسة بصمات الـDNA من قبل الـFBI والذي أُطلق عليه اسم نظام تشخيص الـDNA الموحّد CODIS (Combined DNA Identification System)، ويتضمّن هذا النظام نقل المعلومات بين بنوك مختلفة. وفي المجموعة الأوربية أُسس نظام معلومات آخر أُطلق عليه EDNAP وهو يعتمد على تقنية الـSTR باستعمال أجهزة فاحصات أو ماسحات الجينات (Gene scanners).

وفي عام 1994 عملت وكالة خدمات العلوم الجنائية FSS (The Forensic Science Services) في بريطانيا، والتي تُعدُّ الأولى في العالم، على تجميع وإدخال المعلومات ضد الجريمة، بتطبيق جيل جديد من التحاليل المتعلّقة بالـSTR، والذي أُطلق عليه نظام SG، كما تمّ إدخال فحص حديث آخر هو TGM. وتقدّم المختبرات العلمية لهذه الوكالة خدمات واستشارات ودورات تدريبية على مختلف المستويات لمؤسسات مختلفة في أكثر من 60 دولة في العالم.

هذا ويتم جمع أغلب العينات في الولايات المتحدة من خلال المحاكم القضائية أو المؤسسات الإصلاحية والجهات التنفيذية من الشرطة والـFBI، ومن ثمّ حفظها وتحليلها وإدخالها في بنك المعلومات، إذ تتضمّن المعلومات المسموح بها بصمات الـDNA للمُدانين فقط، وليس بصمات الـDNA المُتحصّل عليها خلال التحقيقات المتعلّقة بالجريمة. إذ يتم حفظ هذه العينات ووضع علامة عليها مع اسم المُذنب ورقم الضمان الاجتماعي وتاريخ الميلاد والعرق والجنس واسم الشخص الذي قام بجمع العينة وتاريخ ومكان الجمع. ويجب نقل العينة إلى المختبر خلال فترة لا تتجاوز 15 يوماً. كما أن هنالك استمارة يجب ملئها تشتمل على معلومات تتضمّن اسم الشخص

المستلم للعينة وتاريخ الاستلام ووثيقة موقّعة تؤكّد عدم التلاعب بالحاوية، ثمّ يتم تقسيم العينة وتعليمها وتخزينها.

إن التلاعب بالعينات يُعدّ جريمة يعاقب عليها القانون، وأن تسرّب أيّة معلومات تعود لشخصٍ ما بدون إذن يُعدُّ مخالفاً للقانون. كما لا يُسمح للمجرم أو للمحامي بالقيام باختبار مُستقل على العينات، ولا يُسمح للمتهم أيضاً بأن يبحث عن المعلومات في البنك بنفسه.

لقد كان لبناء البنوك المعلوماتية لبصمة الـDNA (DNA data banks) فائدة كبيرة من خلال مطابقة بصمة DNA المتّهمين مع قاعدة المعلومات البنكية، إذ أوضحت إحصائيات مكتب العدل (Bureau of Justice Statistics) في عام 1989 بأن 62.5٪ من السجناء الذين تمّ إطلاق سراحهم قد تمّ اعتقالهم مرّةً أخرى، بسبب ارتكابهم جرائم أو مُخالفات أخرى في أقل من 3 سنوات، وأن مرتكبي الاغتصاب الجنسي الذين يتمّ إطلاق سراحهم هم عرضة للاعتقال مرّةً أخرى باحتمالية 10.5 مرة بسبب جرائم الاغتصاب. كما أن الأشخاص المتورطين في القتل أو القتل المُتعمّد هم أكثر احتمالاً من غيرهم للعودة إلى السجون. لذلك أكّد الـFBL على أن إنشاء مثل هذه البنوك سيُسهّل كثيراً في عمل التحقيقات الجنائية.

هذا وعملت وزارة الدفاع الأمريكية على إصدار تعليمات تخص جميع المُلتحقين الجدد بالجيش تؤكّد على ضرورة أخذ عينات من اللعاب والدم، لإجراء بصمة الـDNA لهؤلاء الجنود، ويجب أن يتم ذلك حتى ولو تعرّض الجندي للقتل أو للحرق. وقد صدر قانون في عام 1993 يؤيّد الثقة والأهلية للبنوك المعلوماتية لبصمة الـDNA شريطة أن تُراعي اعتبارات ضبط الجودة والمعايير الاختبارية التأكيدية.

وفي تعديل حديث على قوانين الهجرة، شرَّعت فرنسا في شهر سبتمبر لسنة 2007 قانوناً يُلزم المهاجرين وطالبي تأشيرة الدخول إليها بالخضوع لفحص الحامض النووي، وتحديد البصمة الجينية لكل فرد، وذلك للحدّ من هجرة المهاجرين غير الشرعيين.

كما وتعتزم عدد من دول العالم المتقدمة، كالولايات المتحدة الأمريكية وفرنسا، وضع البصمة الجينية على جوازات السفر للمواطنين، للاستفادة منها عند حصول حوادث مُعيّنة في تحديد هوية هؤلاء الأفراد.

الفصل الحادي عشر

دراسة مسرح الجريمة

11

الفصل الحادي عشر

دراسة مسرح الجريمة

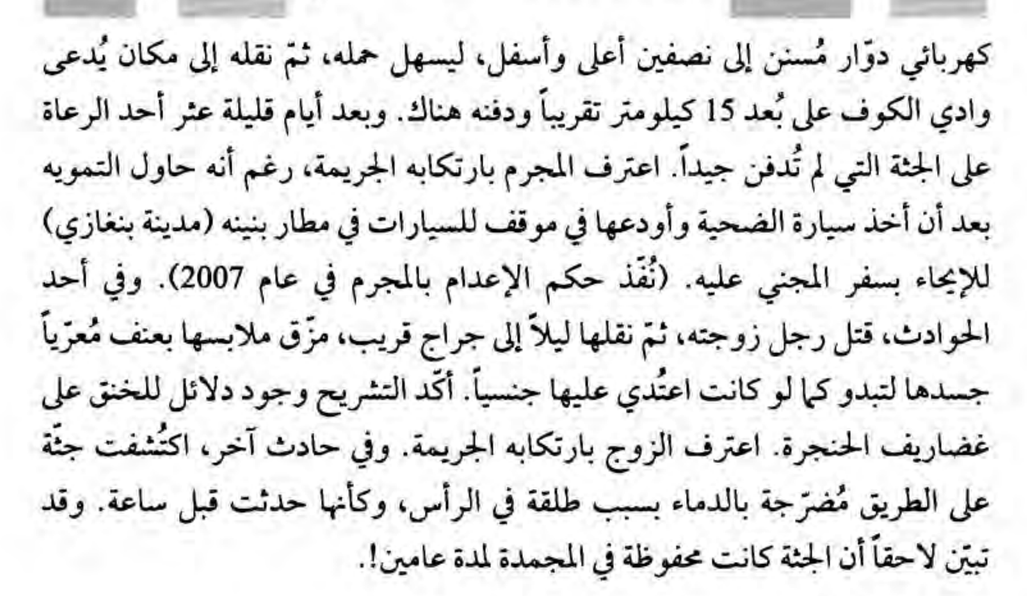
إن دراسة مسرح الجريمة يُعدُّ موضوعاً في غاية الأهمية، خصوصاً وأنه يُبرمج لنا مهام التحرّك الزماني / المكاني نحو عينة DNA تُستخلص وتؤخذ من مصدرها المناسب، كما أنه يُمكّن في النهاية من استنباط السيناريو المحتمل لكيفية حصول الوفاة (حادث أو انتحار أو قتل) وذلك عن طريق المقارنات الموضوعية مع نتائج الفحص التشريحي، وتحاليل المختبر الجنائي.

فحص موقع الجريمة

يُعدّ فحص موقع الجريمة من أهم مفاتيح الحل، خصوصاً وأن جثّة المجني عليه قد تكون تعرّضت للحادث في مكانٍ ما، ثمّ نُقلت إلى مكان آخر، بفعل فاعل أو المجني عليه نفسه. فمثلاً يُطعن شخص ما بجرح نافذ مميت، أو تلتهب النار بملابسه، فيجري لمسافة معيّنة قبل أن ينهار، أو يخرج من بيته هلعاً بعد أن تناول كمية كبيرة من دواء أو مادة سامّة أو جرعة مخدرات، ثمّ يلقى حتفه. وقد دّلت الدراسات على أن ما يقارب 26٪ من الأماكن لا يكون فيها مكان الجثة هو موقع الجريمة الحقيقي.

وهنا لا بُدّ من الإشارة أيضاً إلى عامل الزمن، أي الوقت الذي استُغرق بين لحظة الوفاة ولحظة اكتشاف الجريمة. وهذا قد يتم فيه أيضاً نوع من الخداع والتمويه، فقد يتعرّض شخص لضربة قاتلة على الرأس يعيش بعدها أياماً أو أسابيع، ثمّ يموت في أيّ مكان جرّاء نزف تدريجي في الدماغ. وفي الحوادث التالية بعض التوضيح.

في مدينة البيضاء (ليبيا) قام شخص حدّاد (عراقي الجنسية) بقتل صاحب متجر كهربائيات ضخم الجسم (فلسطيني الجنسية)، بعد أن أقنعه واستدرجه إلى بيته لإبرام صفقة مالية، إذ قام بضربه بآلة حادة على مؤخّرة رأسه، ثم قطعه بوساطة مقص



كهربائي دوّار مُسنن إلى نصفين أعلى وأسفل، ليسهل حمله، ثمّ نقله إلى مكان يُدعى وادي الكوف على بُعد 15 كيلومتر تقريباً ودفنه هناك. وبعد أيام قليلة عثر أحد الرعاة على الجثة التي لم تُدفن جيداً. اعترف المجرم بارتكابه الجريمة، رغم أنه حاول التمويه بعد أن أخذ سيارة الضحية وأودعها في موقف للسيارات في مطار بنينه (مدينة بنغازي) للإيحاء بسفر المجني عليه. (نُفّذ حكم الإعدام بالمجرم في عام 2007). وفي أحد الحوادث، قتل رجل زوجته، ثمّ نقلها ليلاً إلى جراح قريب، مزّق ملابسها بعنف مُعرّياً جسدها لتبدو كما لو كانت اعتُدي عليها جنسياً. أكّد التشريح وجود دلائل للخنق على غضاريف الحنجرة. اعترف الزوج بارتكابه الجريمة. وفي حادث آخر، اكتُشفت جثّة على الطريق مُضرّجة بالدماء بسبب طلقة في الرأس، وكأنها حدثت قبل ساعة. وقد تبيّن لاحقاً أن الجثة كانت محفوظة في المجمدة لمدة عامين!.

فحص الجثّة (The Autopsy):

إن كلمة (Autopsy) مُناظرة لكلمة Necropsy (فحص الجثة، أو تشريحها، أو فتح الجثة)، والتي تستعمل عادةً في الفحص بعد الوفاة، علماً بأن الكلمة الثانية قد تستعمل أحياناً لتعني الفحص الخارجي للجثة بعد الموت فقط.

هنالك نوعان من عمليات فحص الجثث، وهما:

1. فحص الجثة السريري (The clinical autopsy)، عندما يكون سبب الوفاة معروفاً في الغالب، إذ يُجرى الفحص لغرض التشخيص واكتشاف مدى الإصابات للأغراض الأكاديمية والتعليمية والبحثية.
2. فحص الجثة للأغراض الطبية الشرعية (The medico-legal autopsy)، ويتم هذا الفحص لاكتشاف بعض أو كل النقاط المُشار إليها أدناه:
   أ. هوية الجسم.
   ب. سبب الوفاة.
   ج. طبيعة وعدد الإصابات.
   د. وقت الوفاة.



هـ. وجود سموم.

و. توقّع العمر لأغراض الضمان.

ز. وجود أمراض طبيعية، ومدى مساهمتها في حدوث الموت، وخصوصاً إذا رافق ذلك التعرّض إلى إصابة جسدية.

ح. التنبّؤ بطبيعة الإصابات، هل هي جنائية أو انتحارية أو ناتجة عن حادث.

ط. التنبّؤ عن أي ظروف أخرى غير طبيعية، تشمل تلك التي ترافق مع العمليات الطبية والجراحية.

الطب العدلي وعلم الأمراض (Forensic pathology):

لكي يتعرّف أخصائي علم الأمراض (Pathologist) على أسباب وطريقة الوفاة وكيفية حدوثها، يجب عمل فحص شامل، فقد يكون تشريح الجثة غير كافٍ لمعرفة هذه الأسباب، ولكنه يجب الاستعانة بالتعرّف على ظروف مسرح الجريمة، وكذلك بعض المعلومات عن تاريخ القتيل.

أ. سبب وطريقة الوفاة وظروفها:

قد تحدث الوفاة نتيجة لإصابة أو لمرض كان سبباً في توالي الأحداث التي أدّت في النهاية إلى الموت. وقد يكون سبب الوفاة إما قريباً (Proximate) أو في حينه (Immediate)، فمثلاً إذا سقط جدار على عامل بناء فأصابه بالشلل، وأدّى ذلك الشلل إلى فقدان السيطرة على المثانة البولية، فنتج عن ذلك إصابات بكتيرية في المثانة، ممّا أدّى إلى وفاة العامل، ففي هذه الحالة يكون السبب القريب للوفاة هو الإصابة التي جعلته مشلولاً، والسبب الحيني هو الإصابة البكتيرية للمثانة.

ولا تؤثّر المدّة الزمنية بين السبب القريب أو المباشر والسبب الحيني في سبب الوفاة، طالما أن الأحداث كانت مستمرة ومتابعة، فقد تكون تلك الفترة عبارة عن دقائق أو أيام أو سنين.

ويحدث الموت عن طريق (Mechanism) التغيرات البيوكيميائية والفسيولوجية غير الطبيعية التي أدّت إلى الوفاة.

ومن الأمثلة على طرق الوفاة، هي الصدمة (Shock)، وكذلك التوقف القلبي الرئوي (Cardiac respiratory arrest). وتختلف طريقة الوفاة عموماً عن أسباب الوفاة، ويجب كتابة طريقة الوفاة وحدها في شهادة الوفاة. فمثلاً إذا أصاب طلق ناري دماغ شخص ما، وأدّى ذلك إلى وجود انتفاخات وأورام في المخ أدّت إلى الوفاة، فيكون هنا سبب الوفاة هو الطلق الناري، وهو الذي يُكتب في شهادة الوفاة، وليس طريقة الوفاة التي هي انتفاخات وأورام في المخ.

أما ظروف (Manner) الوفاة، فهي الأحداث التي تُحيط بالوفاة. وعموماً تُقسم ظروف الموت إلى ما يأتي:

1. القتل.
2. الانتحار.
3. حادث.
4. طبيعي.
5. مجهول.

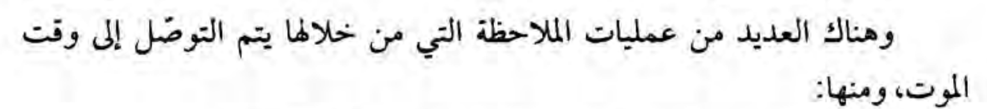
تحديد وقت الموت والتحلّل

Time of Death, Decomposition and Identification

تحديد وقت الموت

تُعدّ عملية تحديد وقت الوفاة بعد اكتشاف الجثة بمدة ما، عملية صعبة، ولكن الأخصائي يحاول تحديد الوقت الدقيق الذي حدثت فيه الوفاة قدر الإمكان. وتكون العملية أكثر سهولة إذا كان هناك شهود لعملية القتل. وعموماً كلّما زادت المدة بين وقت الموت ووقت اكتشاف الجثة، كلما كان تحديد الوقت الدقيق لعملية الموت أصعب.

وهناك بعض الملاحظات التي يجب مراعاتها لتحديد زمن الوفاة، ومنها: درجة حرارة الجسم، وتحلل أنسجة الجسم، ومحتويات المعدة. كما يجب أن نضع في الاعتبار قيمة الوسط والمناخ الذي توجد فيه الجثة، إذ إن لها الأثر الأكبر في تحديد موعد الموت.



وهناك العديد من عمليات الملاحظة التي من خلالها يتم التوصّل إلى وقت الموت، ومنها:

1. ملاحظات ريجور مورتيس (التخشّب الموتي) (Rigor Mortis):

تُعرف ظاهرة التيبّس أو التخشّب الموتي، بأنها حالة من التقلص التي تحدث في كل عضلات الجسم بعد الموت. تستبدل حالة الارتخاء الأول (Primary faccidity) ناتجة عن فقدان الـATP اللازم لفصل الخويطات العضلية الأكتين (Actin) والميوسين (Myosin) خلال الارتخاء.

إن العضلات تبقى في حالة التخشّب حتى يحدث لبروتينات العضلات تحلل بكتيري، وهذا مهم من الناحية الطبية العدلية (Medicolegal) لتحديد وقت الوفاة، إذ يبدأ بعد ساعتين، ويصل إلى قمّته بعد 18 ساعة، ويختفي بعد 24 ساعة.

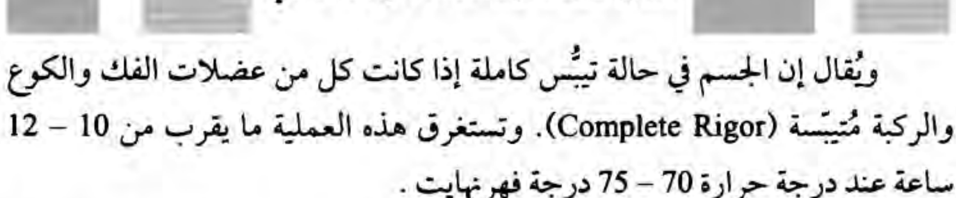
تكون الجثة مرتخية تماماً بعد الموت مباشرةً، وبعد ذلك بمدّة 1 – 3 ساعات، تبدأ الجثة بالتصلّب تدريجياً وتتجمّد المفاصل.

وتظهر ملاحظات ريجور مورتيس أسرع كلما كانت درجة حرارة الجسم مرتفعة أكثر . الشخص المصاب بالحمّى تظهر عليه هذه الملاحظات أسرع من الشخص الغير مصاب بها .

كذلك تظهر الأعراض أكثر سرعة إذا كان الشخص المتوفي يقوم بنشاط عضلي أكبر قبل الوفاة مباشرةً .

كذلك تتم عمليات ريجور مورتيس بصورة أسرع في المناطق الحارة عنها في المناطق الباردة .

وتتصلّب عضلات الجسم كلها في موعد واحد، ولكن بمعدلات مختلفة، وذلك حسب حجم العضلة، فمثلاً تتصلّب عضلات الفك بسرعة أكبر من تصلّب عضلات الركبة، ولذلك يجب على الطبيب العدلي أن يُلاحظ حركة كل من الفك والأذرع والأرجل .



ويُقال إن الجسم في حالة تيبُّس كاملة إذا كانت كل من عضلات الفك والكوع والركبة مُتيبّسة (Complete Rigor). وتستغرق هذه العملية ما يقرب من 10 – 12 ساعة عند درجة حرارة 70 – 75 درجة فهرنهايت .

ويستمر الجسم في حالة تيبّس لفترة ما يقرب من 24 – 38 ساعة، وذلك قبل أن تتفكّك العضلات مرة أخرى بالترتيب نفسه الذي تيبّست به.

ويجب ملاحظة أن الجسم يظل متيّبساً حتى تفكيك أو يتم تحريك أحد مفاصله ميكانيكياً (عمداً)، ولذلك يمكن التعرّف عمّا إذا كان تم تحريك ونقل الجثة بعد الموت أو ظلّت مكانها.

2. ملاحظات ليفور مورتيس (Livor Mortis):

وتهتم هذه الملاحظات بالتغيّرات في لون الجثة بعد الموت. وهي تعتمد على توقّف ضخ الدم في الجسم بعد الوفاة، وتأثير الجاذبية الأرضية عليه، إذ يكون لون الجلد أحمر قرمزي (Purple red)، وتظهر ملاحظات ليفور مورتيس بعد ساعة واحدة من الوفاة، إذ تزداد قوة لون الدم تدريجياً حتى تثبت في مدة 8 ساعات. وإذا ضُغط على الجلد في هذه المرحلة، فإن لونه لا يختفي أو يتغيّر حتى إذا تغيّر موضع الجثة.

ويجب ملاحظة أن تحريك الجثة يتم التعرّف عليه إذا تمّ العثور على كمية من الدم في مناطق كانت خالية منه بفعل الجاذبية أثناء الموت، وذلك من خلال لون الدم بها في الجلد. وملاحظات ليفور مورتيس تظل قائمة حتى يتحلل الجسم.

عند الوفاة إذا كان السبب التسمم بكل من أول أوكسيد الكربون أو السيانيد، أو بسبب هبوط درجة الحرارة أو تجمّد الجسم، يكون لون الجلد أحمر جداً (لون الكرز Bright cheery). أما لون الجلد عند الموت نتيجة فقدان الدم (نزيف)، فيكون فاتحاً أو ليس له لون ، لعدم وجود الدم فيه.

ويجب ملاحظة أن من الصعب تطبيق ملاحظات ليفور مورتيس على الأفراد ذوي البشرة الداكنة.

3. ملاحظات ألجور مورتيس (Algor Mortis):

وتسمّى ملاحظات تبريد الجسم (Body cooling).

بعد الوفاة يفقد الجسم حرارته المعتادة ليأخذ درجة حرارة الوسط المتواجد فيه. وعموماً يُفيد النقص في درجات الحرارة في الساعات العشرة الأولى بعد الوفاة، ففي الظروف العادية تتراوح درجة الحرارة ما بين 70 - 75 درجة فهرنهايت، يفقد الجسم ما يعادل 15 درجة فهرنهايت كل ساعة.

ويجب ملاحظة أن استعمال درجة الحرارة في تحديد زمن الوفاة قد يكون فيها بعض الاستثناءات، وذلك لأن درجة حرارة الجسم 98.6 درجة فهرنهايت (37 درجة مئوية)، تختلف عن درجة حرارة الجو الطبيعي 70 - 75 درجة فهرنهايت (21 - 24 درجة مئوية). فمثلاً: (1) إذا كان المتوفى مات نتيجة إصابته بالحمّى أو نشاط عضلي كبير، فارتفعت درجة حرارته، فهنا لا يمكن تطبيق ملاحظات ألجور مورتيس. (2) قد تكتسب الجثة درجة حرارة أكثر ممّا كانت عليه قبل الوفاة، وذلك إذا كانت درجة حرارة الجو عالية (فصل الصيف). ويجب أخذ درجة الحرارة مرتين مختلفتين، وذلك قبل تحريك الجثة. ويتم أخذ الحرارة من كل من الشرج والكبد، ويجب تسجيل درجة حرارة الجو أيضاً أثناء قياس درجة حرارة الجثة.

محتويات المعدة (Stomach contents):

يجب تحديد الوصف التفصيلي لمحتويات المعدة من طعام وسوائل من ناحية الحجم والنوع أثناء التشريح.

وتُفيد محتويات المعدة أولاً في تحديد نوع آخِر طعام قام المتوفى بتناوله، وكذلك محتوياته. وثانياً تدل المحتويات على ميعاد آخِر وجبة تناولها المتوفى.

فمثلاً إذا كان الطعام المتواجد هو طعام الإفطار، وتم اكتشاف الجثة في المساء، فيدل ذلك على أن الموت تمّ في الصباح.

ب- التحلل (Decomposition):

أولاً: يتحوّل الجلد إلى اللون الأخضر في منطقة البطن.

ثانياً: يبدأ انتشار هذا التحوّل في اللون إلى باقي أجزاء الجثة.

ثالثاً: تورّم الجثة نتيجة خروج غاز الميثان بوساطة البكتريا المتواجدة بصفة طبيعية في الجسم، وتنشط أكثر في الجو الحار. ويعتمد معدل وطبيعة تحلّل الجثة أساساً على المناخ المتواجدة فيه، فيختلف تحلّل الجثة التي تمّ دفنها في الأرض عن تلك التي ألقيت في الماء أو تمّ تركها في الشمس أو في مكان بارد.

رابعاً: عندما تنتفخ الجثة تظهر تسلّخات جلدية، ويؤدي إلى تكسير صبغة الدم (الهيموجلوبين)، إلى أن تظهر الأوعية الدموية المحتوية على مواد التكسير من تحت الجلد بشكل مشابه للتعرّقات التي تظهر في الرخام، ولذلك تسمّى هذه العملية بالترّخم (Subcutaneous marbling).

خامساً: يتم تساقط الشعر من على الجثة.

سادساً: يؤدي الانتفاخ وارتفاع الضغط الداخلي للجثة بالغازات الناتجة عن البكتريا إلى خروج الدم وسوائل الجسم من فتحاته الخارجية.

سابعاً: يتم بعد ذلك تحوّل الجثة إلى هيكل عظمي تدريجياً بعد تآكل عضلاته. ويعتمد معدّل التحوّل على الظروف المناخية المحيطة بالجثة، فعند درجة حرارة 37.7 °م تتحوّل الجثة إلى هيكل عظمي خلال أسابيع قليلة. وعند درجة حرارة 18 °م قد لا تتحوّل الجثة إلى الهيكل إلاّ بعد مرور شهور أو سنين. وبصفة عامة، فالجثة التي تُترك فوق الأرض بعد الموت لمدّة أسبوع تكون ظاهرياً مُشابهة للجثة التي تُركت في الماء لمدة أسبوعين، أو تمّ وضعها في قبر لمدة ستة أسابيع.

ويجب ملاحظة أن الجثث المكشوفة تتحلّل بصورة أسرع من تلك المُغطّاة أو المُكفّنة.

وعند العثور على الجثة يجب وضعها في الثلاجة مباشرةً، حتى يتم الانتهاء من إجراء التشريح والفحص وأخذ العينات المناسبة، إذ إن درجة حرارة الثلاجة توقف

عمليات التحلّل نهائياً، وبعد الانتهاء من فحص الجثة ووضعها في درجة الحرارة العادية، يكون معدل تحلّلها أسرع ممّا كانت عليه قبل وضعها في الثلاجة.

ويتم التحلّل في المناطق المصابة والمجروحة بمعدل أسرع من المناطق السليمة، وذلك نتيجة حدوث النزيف وتواجد الدم ومُشتقّاته.

بعد الكشف عن موقع الجريمة، تقوم الشرطة بتحديد المنطقة ووضع حاجز حولها لمنع غير المتخصصين من محو أو إضافة آثار جديدة، بقصد أو بغير قصد، أو نقل الدماء والدلائل البيولوجية من موقع إلى آخر بوساطة الأقدام. في حين يرتدي أعضاء الفريق المتخصص الأكياس البلاستيكية في أقدامهم. ويجب أن يراعى في ذلك بقاء كبار المسؤولين بعيداً في المراحل الأولية من التحقيق، كما يُمنع إجراء الحوارات واللقاءات مع الأجهزة الإعلامية. أما آراء الجمهور فيجب أن يتم التعامل معها بحذر، فقد يكون أحدهم هو الجاني، ويُعطي إجابات مُضلّلة لأعضاء الفريق.

مسرح وأداة الجريمة:

يتباين مسرح الجريمة، فقد يكون داخل المنزل أو خارجه، على سطح الماء أو اليابسة، وقد تكون الجثة عارية أو مغطّاة، مدفونة جزئياً أو كلياً... الخ. وبشكل عام يكون المكان المُغلق أفضل من المكان المفتوح، لأن العوامل البيئية في الخلاء تكون أشد تأثيراً، فالرياح تأخذ معها بعض الآثار المهمة كالشعر، أو تطمس بعض الدلائل، كآثار الأقدام وبقع الدم التي تُغطّى بالأتربة، فضلاً عن الفعل المدمّر للحيوانات.

هذا وقد يوحي مسرح الجريمة وخصوصاً داخل المنزل إلى بعض ما دار في اللحظات الأخيرة من وقوع الجريمة. هل الأشياء في مكانها، أم تظهر عليها آثار بعثرة وفقدان؟ وهنا لا بُدَّ من توخّي الحذر، فقد يعمد الجاني إلى التلاعب بمعالم مسرح الجريمة بما يخدم مصلحته في الخداع ومنع الوصول إليه.

في المراحل الأولية وقبل نقل الجثة إلى المشرحة، يهتم كل عضو من الفريق بتخصصه. فرجل الأمن يهتم بالباب الرئيسي، إذا كان مكسوراً أم سليماً، مغلقاً أم مفتوحاً، وكذلك بالنسبة للأبواب الأخرى والنوافذ، فضلاً عن أجهزة المنزل كالتلفزيون والراديو والحاسوب والهاتف والثلاجة، أي رسالة أو ورقة مكتوبة، فحص

المطبخ والحمام. يتم رفع البصمات من الأسطح الناعمة والملساء، وكذلك تصوير المكان بكاميرات عادية أو فيديو، فضلاً عن إعداد المخططات من قبل الرسامون، وهكذا.

في حين يتوجّه فكر الطبيب إلى طبيعة الوفاة وسببها، فهل هي طبيعية أم حادث عرضي أم انتحار أم جريمة قتل؟ إذ يقوم بفحص الجثة وتحديد نوعية الإصابة، ثمّ يجمع كل الآثار والدلائل والعينات، كالدماء، القيء، المخاط، اللُعاب، المني، البول، البراز، الشعر، الألياف، قطع الملابس، الأتربة، الحُقن، المخدرات، آثار وأدوات أخرى. مُركّزاً خلال ذلك على ما يُسمّى بعلم الجريمة بـ(مبدأ التبادل)، والذي يعني أن الجاني قد يترك أثراً على الضحية أو حولها، وكذلك قد تترك الضحية أثراً على الجاني. وبعد أن يُكمل أعضاء الفريق إجراءاتهم الأولية، يُعطي الطبيب إرشاداته حول كيفية إخلاء الجثة إلى المشرحة.

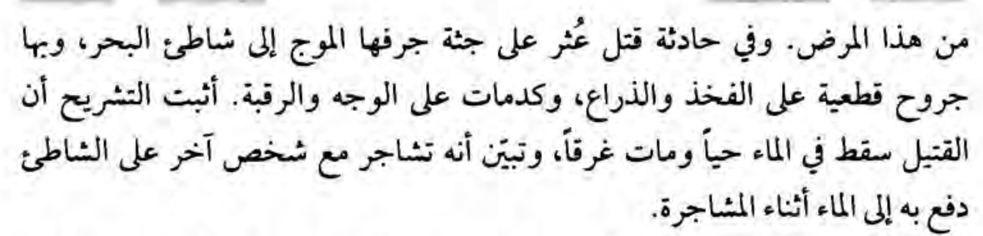
والحالات التالية تُبيّن أهمية الآثار البسيطة التي قد تُهمل أو تُفقد، رغم أنها قادت إلى الجاني. فقد عُثر على شخص مقتول بسكين، بعدّة طعنات نافذة في بطنه وصدره، ومُلقى على الشارع العام، وبعد فحص ملابسه والدماء المُضرّج بها، لوحظ اختلاطها بحُبيبات زجاج ناعمة، قادت إلى ورشة لقص الزجاج كان المجني عليه يتردّد عليها في الأيام الأخيرة قبل قتله.

يمكن فحص الألياف الملتصقة بملابس أو جسم الشخص تحت الميكروسكوب، والتعرّف على نوعها ولونها وطبيعتها (صناعية، طبيعية، صوف، قطن، كتان، نايلون... الخ)، فهي تساعد في معرفة المكان الذي كان فيه. كما أن الشعر المتواجد في مسرح الجريمة ، سواء كان بشرياً أم حيوانياً أو زغب أو ريش الطيور، يمكن أن يُفيد في هذا المجال. وعند فحص الشعرة تحت الميكروسكوب، يُلاحظ عليها الكثير من العلامات، مثل طول الشعرة ولونها، وكيفية التفافها وتعرّجها، وسمكها ومدى سلامتها... الخ. إذ إن التلف والتشققات والأضرار التي تحدث في محور الشعرة تعكس مدى النظافة والاهتمام الشخصي، ومن ثمّ فهل بالإمكان أن تعود لهذا الشخص أم لا؟

كما أن تأثيرات مكونات الشامبوات والمنظفات والصابون ومزينات وأصباغ الشعر، يمكن تتبّعها بدقّة. إن لاستعمال هذه المواد آثاراً مباشرة وغير مباشرة على الشعر لا بُدَّ من ملاحظتها بإمعان، إذ إن لهذه المواد آثاراً مباشرة تظهر بعد مدة قصيرة من الاستعمال، وغير مباشرة تُلاحظ بعد مدة أطول، ويمكن الاستدلال على كل ذلك سواء بالفحص العياني أو بالعدسات المُكبّرة، أو المجاهر الاعتيادية أو الإلكترونية (وخصوصاً عند فحص بقايا تلك المواد على الشعر). ففي إحدى الجرائم اختفت طالبة نهاية اليوم الدراسي، وعُثر عليها مساء اليوم نفسه مقتولة خنقاً ومُلقاة في حديقة المدرسة. أظهر الفحص بالعدسات المكبّرة وجود شعيرات سجادة على ملابسها، وقد تبيّن لاحقاً أنها تعود إلى سجادة في بيت مدير المدرسة. كان المدير قد استدرج الطلبة إلى منزله واغتصبها ثمّ خنقها وألقاها في حديقة المدرسة. وفي جريمة أخرى، وُجدت فتاة مقتولة على الطريق، وأثناء فحص الطبيب لها تبيّن بأنها تعرّضت للاغتصاب، وقد عُثر على ورقة شجر يابسة في ملابسها. وبعد استدعاء أحد خبراء علم النبات من إحدى الجامعات، أشار إلى أن هذه الورقة تعود إلى أشجار غير موجودة في المنطقة نفسها، بل في متنزّه يبعد 20 كم عن المنطقة. وقد تمّ التوصّل إلى الجاني الذي يُقيم بالقرب من المتنزّه، والذي قام باغتصاب الفتاة تحت إحدى هذه الأشجار. وفي حادثة مشابهة أرشد التراب الموجود على الجثة، لكونه لم يكن من تراب المنطقة نفسها، على مكان الجريمة الأصلي، بعد الاستعانة بأحد الخبراء الجيولوجيين. وفي مدينة البيضاء (ليبيا) عُثر على رجل قام بالانتحار بعد أن أطلق رصاصة على رأسه. وقد ترك قصاصة ورق سجائر صغيرة في جيب معطفه، كتب عليها اعترافه بالإقدام على قتل نفسه، تؤكّد قيامه بالانتحار، فضلاً عن الأدلة الأخرى.

وعن المنظر العام للموقف وما قد يوحي إليه، نذكر الحوادث الآتية:

رجل في الخمسين من عمره ويعيش بمفرده، لم يُشاهد منذ أسبوعين. حين دخل فريق البحث الجنائي إلى منزله وجدوا أدواته مبعثرة وجسده شبه عارٍ وعليه آثار سحجات وكدمات، وهذا ما يُشير إلى وقوع عنف، إلاّ أن التشريح بيّن موته من جرّاء مرض التهاب السحايا الذي يؤدي إلى قيام المريض نفسه بالعنف في المراحل الأخيرة



من هذا المرض. وفي حادثة قتل عُثر على جثة جرفها الموج إلى شاطئ البحر، وبها جروح قطعية على الفخذ والذراع، وكدمات على الوجه والرقبة. أثبت التشريح أن القتيل سقط في الماء حياً ومات غرقاً، وتبيّن أنه تشاجر مع شخص آخر على الشاطئ دفع به إلى الماء أثناء المشاجرة.

هذا ولا بُدّ من ملاحظة أثر المهنة على الجسد أو الملابس، فهي تُفيد في التعرّف والاستدلال، فالحداد وميكانيكي السيارات يمكن الاستدلال عليهما مثلاً من خلال آثار المهنة على أصابع وراحة اليد، والجزّار يمكن الاستدلال عليه من رائحة اللحم والدم في ملابس العمل، وهكذا بالنسبة لبقية المهن الأخرى.

التعرّف على بقايا:

إن الخطوة الأولى هنا، هي إثبات ما إذا كانت تلك البقايا آدمية أم حيوانية. بعد الانتهاء من هذه المرحلة، لا بُدّ من التعرّف على الجنس، ذكر أم أنثى، وذلك من خلال عظام الحوض والجمجمة التي تتميّز بوجود علامات فارقة كثيرة بين الجنسين. ثمّ بعد ذلك يتم التوجّه إلى قياس أطوال العظام، وما إذا كانت تظهر عليها آثار كسور وأسلحة.

وقد أمكن في السنوات الأخيرة باستعمال الكومبيوتر، من رسم صورة تقريبية للشخص على جمجمته، ولكن ينقصها الدقةّ وعاجزة عن إظهار الواقع الحيوي بتفاصيله السابقة.

أهمية الدماء:

من الدلائل المهمة التي على الطبيب الالتفات إليها، هي الدماء، فهل هذا اللون الذي أمامه دم أم لا؟ وهل هي دماء آدمية أم حيوانية؟ إلى أن يصل إلى مرحلة تحديد المجموعة، وإذا كانت العينة الدموية غير صالحة لفحص مجموعة الدم، فهنا لا بُدَّ من العودة إلى إجراء البصمة الجينية بالاعتماد على الـDNA المستخلص من تلك العينة الدموية. هذا وقد تساعد إفرازات الجسم كاللُعاب والعرق وعصارة المعدة في التعرّف على مجموعة الدم في 80٪ من البشر.

كما أن سيل الدم على الجثة له دلالة أيضاً، فإذا كان طولياً، فهذا يعني أنه سال في وضع الوقوف، وإن كان دائرياً حول الجسم، فذلك يعني أنه سال في وضع الاستلقاء.

النزف:

وهو فقدان كمية من الدم (أكثر من 40٪)، يؤدي إلى غياب الوعي والوفاة. فبعض المصابين يفقد وعيه بسرعة، وبعضهم يتحرّك، وربما يجري لمسافات طويلة قبل سقوطه. وغالباً ما يتوقّف النزف بعد الوفاة، لكنّه قد يستمر لفترة وجيزة من بعض الأماكن، مثل فروة الرأس.

السلاح وموقع الجريمة:

يكون السلاح موجوداً في الموقع عند حالات الخطأ والانتحار، (إلاّ إذا قام شخص ما بإخفائه)، وهنا لا نعثر على آثار تخريب، كما يمكن أن يموت المنتحر وهو قابض على سلاحه، وإذا حدث أن أدّت قوة رد الفعل إلى دفع السلاح، فإنه يبقى في المكان. أما في القتل العمد، فيندر وجود السلاح، ويكون الإطلاق من مسافات أبعد وعلى أماكن غير تلك المفضّلة بالانتحار (كالصدغ والفم). فمن المستحيل أن يُطلق المنتحر النار على نفسه من الخلف. ولكن بعض المُتفننين قد يقوم بربط زناد المسدس بعد تثبيته بحبل على مسافة معيّنة لا تدلّ على أنه هو الفاعل، ثمّ يطلق النار على نفسه، أو يتّفق مع شخص آخر لإطلاق النار عليه، أو يُطلق النار هو بنفسه على منطقة غير قاتلة في جسمه، كأن يسحب الجلد بيده من خاصرته بعيداً ثمّ يطلق النار (أو يطلق على أصابع القدم)، كما حصل وفعل بعض الجنود في الحرب العراقية – الإيرانية للتهرّب من ساحة الحرب المُشتعلة (وبعض الشّر أهون).

قال لي أحد الجنود بأنه قام وبالاتفاق مع زميله على أن يُطلق رصاصة على قدمه اليسرى بعد أن يضع أمام فوهة المسدس قارورة الماء (الزمزمية التي يستعملها الجنود لشرب الماء) للتقليل من حرارة الرصاصة وضررها حسب اعتقاده... ذكر لي ذلك بعد أن سألته عن سبب التشوّه الموجود على مشط قدمه.

الدم وموقع الجريمة:

في البداية لا بُدّ من معرفة هل تلك الدماء حقيقية أم أصباغ، وهل هي دماء إنسان أم حيوان، وتوجد اختبارات معيّنة لحل هذه المشاكل. كما أن شكل قطرات الدم وتوزيعها في مسرح الجريمة له دور مهم في تفسير ما حدث عند تنفيذ الجريمة. فالشريان مثلاً يقذف الدم إلى مسافات بعيدة على الجدران والمكان، وينتشر الدم أثناء حركات الطعن المتكررة. أما الدم النازف من الوريد فيتجمّع على شكل بقعة. والنقاط الساقطة في مسار خطي تدل على تحرك جسم نازف. القطرة التي تسقط بوضع عمودي تكون مستديرة ذات حافة مُسنّنة، والتي تسقط بزاوية أثناء الحركة تكون كمثرية أو على شكل علامة التعجّب، مُشيرةً إلى اتجاه الحركة. طبع آثار الدم يعني أن شخص مشى في الموقع، وهذه الطبعات قد تعود للضحية أو للجاني، كما أن شكل طبعات الأقدام سواء كانت عارية أو بحذاء يجب أن يؤخذ بنظر الاعتبار للأهميّة. فالأقدام العارية يمكن أن ترسم بصمة أصابع القدم، وتطبعها على شكل بقعة دم على الأسطح الناعمة كالسيراميك مثلاً، وشكل التخطيطات على قاعدة الحذاء يمكن أن تساعد هنا أيضاً، وهكذا.

تحديد زمن الوفاة من الموقع:

من المهم هنا الاستفادة من الموقع في تحديد هذا الزمن، فالعثور على الجثة داخل المنزل يُسهّل المهمة، إذ أصبح من المعتاد أن يموت شخص يعيش بمفرده في منزله ولا ينكشف أمره إلاّ بعد انبعاث الرائحة الكريهة وزيادة حركة الحيوانات حول بيته. وقد نستطيع الاقتراب أكثر من تحديد هذا الزمن من خلال تواريخ الصحف الموجودة على طاولته، كما أن فحص بقايا الأكل على المنضدة والمطبخ يمكن أن يساعد أيضاً. فضلاً عن ذلك فإن آخر المكالمات الصادرة الموجودة في نقّال الضحية يمكن أن يخدم نفس الغرض.

وفي العراء فإن برودة الجسم والتغيرات التي تحدث بعد الوفاة ترتبط بالظروف البيئية، كدرجة حرارة الجو ونسبة الرطوبة وسرعة الرياح، كما أن يرقات الحشرات

ومرّات انسلاخها، وخصوصاً ذباب الجثث الذي يضع بيوضه داخل الجثة للفقس والنمو.

هنالك ما يزيد على 10 أنواع من الذباب، وبعض أنواع الخنافس والنمل تبيض وتتغذى يرقاتها على الجثث، ومنها ما يضع أعداداً كبيرة من البيض، إذ إن أحد أنواع الذباب يضع 300 بيضة في المرة الواحدة، ويكرر ذلك 10 مرات في حياته. إذ تحتاج إناث تلك الحشرات إلى وجبة بروتينية لتكوين البيض، فتبحث عن جثث أو براز. وبعض الذباب يضع بيضاً مُخصّباً داخل الجثة، والبعض الآخر يضع اليرقات مباشرةً في الجثة (مثل ذبابة اللحم). ومن هذا الذباب ما يتميّز بألوان زرقاء أو خضراء برّاقة. يحوم الذباب حول الجثة بعد دقائق من إلقائها، ويبدأ بوضع البيض خلال ساعة في فتحات الجسم الطبيعية والجروح.

كما أن نمو الفطريات على الجثة، وعلاقته بالفترة الزمنية لدورة الحياة يمكن أن يُعطي دلائل مهمة لمساعدة الخبير البيولوجي في تحديد زمن الوفاة.

وفي أحيان أخرى، وخصوصاً بعد فترات طويلة نسبياً، تنمو نباتات عشبية أو شجرية بين أجزاء الجثة، بحيث يمكن تحديد عمر هذه النباتات من خلال المقاطع العرضية في سيقانها أو جذورها، ولكن المشكلة في العراء تكون أكثر تعقيداً، لأن بعض الحيوانات تلتهم الجثة وتطمس الكثير من الأدلة، مع العلم بأن تلك الحيوانات قد تقدّم خدمة لفرق البحث، فكثرة حركتها ونبشها في التراب غالباً ما يُشير إلى جثة مدفونة.

أما في الماء، فإن طفو الجثة بعد فترة من سقوطها في الماء لا يعني الكثير بالنسبة لتحديد زمن الوفاة، فهو مرتبط بنسبة الدهون في الجسم، وسرعة تكوّن الغازات داخل الجثة، إذ لوحظ بأن جثث النساء والجثث السمينة تطفو أسرع من غيرها. وقد تقوم الأسماك والحيوانات المائية بالتهام الجثة وطمس الكثير من معالمها. وللتنويه فقط، فإن الماء المالح (ماء البحار والبحيرات المالحة) يُشكل مادة حافظة للجثّة بفعل وجود الملح، ممّا يُطيل من الفترة اللازمة لتفسّخ الجثة، مقارنةً بالمياه العذبة، كما أن الجثث تكون أسرع طفواً في المياه المالحة مقارنةً بالمياه الحلوة، وذلك بفعل الكثافة العالية للماء المالح.

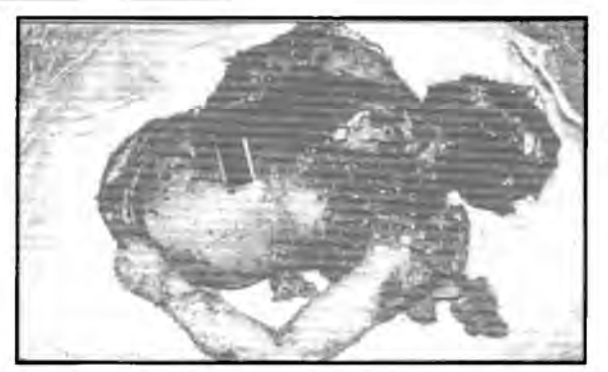
مواقع الحريق:

بحدود 70٪ من وفيات الحرائق تحدث في المنازل، وأكثرها يبدأ في المطبخ، خصوصاً من جرّاء تسرّب الغاز بسبب المفاتيح والأنابيب المعطوبة أو الغير محكمة الغلق، وعندما ينشغل الشخص المحروق بنفسه، يهرب ويترك مفتاح الغاز مفتوحاً، ممّا يزيد الطين بلّة. كما أن نسبة لا بأس بها من حرائق البيوت يكون سببها الأطفال والإهمال من جرّاء ترك عيدان الثقاب والقداحات النارية في متناولهم، وبنسبة 10٪ من الحرائق تكون متعمّدة أو للمكيدة أو محاولات انتحار. وتساهم الطاقة الكهربائية وبالذات تماسّات الأسلاك الكهربائية أيضاً في هذه الحوادث. ففي أحد الحوادث كان قُرب المصباح الكهربائي من قطع القماش التي نضدت فوق دولاب الملابس سبباً في اندلاع حريق ضخم التهم معظم الدار تقريباً.

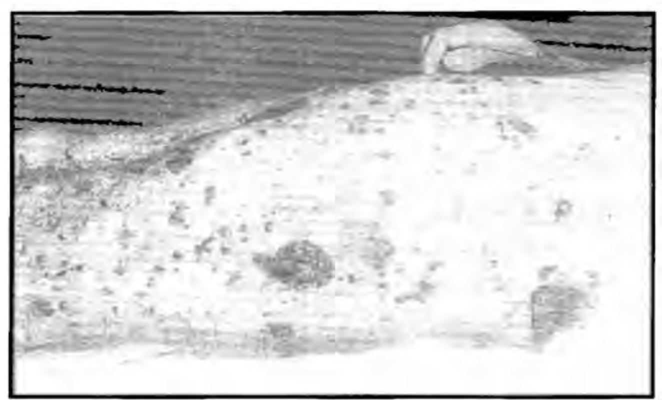
وإذا امتد الحريق وباغت عدداً كبيراً من سكان بناية ما، عندئذ تتنوّع الإصابات لتشمل إضافة للحروق المباشرة، الاختناق بالغازات الساخنة والسامّة وضحايا انهيار البناية أو أجزاء منها. هذا وتساهم أشعة الشمس بشكل أو بآخر في حدوث بعض الحرائق، إذ تصل درجة الحرارة في العراق وتحت أشعة الشمس الملتهبة إلى رفع درجة الحرارة لأكثر من 50 °م مُسبّبةً انفجار غالونات البنزين، ولربَّ قطعة زجاج معيّنة مرمية على عشب جاف أدّت ولأكثر من مرة إلى تركيز الأشعة وإحراق العشب وما حوله.

الانفجارات الضخمة:

في المناطق الصناعية والمزدحمة، تؤدي الانفجارات الضخمة في خزانات الغاز والوقود، أو نتيجة الأعمال الإرهابية إلى حدوث خسائر كبيرة في الأرواح والأموال، إذ ينتج عنها تأثير مزدوج، يتمثّل الأول عن الضغط الهائل والخلخلة والعصف، والتي في الغالب تؤدي إلى تناثر الأجسام وانهيار وتصدّع المباني، والثاني انتشار الحريق والأجزاء المتفجّرة والمشتعلة في كل اتجاه. تُقذف الأشلاء انطلاقاً من مركز الانفجار إلى مسافات أبعد، بحيث يمكن الوصول إلى هذا المركز من خلال ملاحظة اتجاه الجدران الساقطة والأبواب والشبابيك والأجسام المتطايرة (الشكلان 11 – 1، 11 – 2).



شكل (11 – 1). أدت قوة الانفجار إلى تمزّق جسد الضحية بهذه الصورة، وتبعثر الأشلاء بعيداً عن الجزء الرئيسي من الجسد



شكل (11 – 2). أحد ضحايا المتفجرات، تبيّن اجتماع ثلاثة أنواع من الجروح المُميّزة لهذا النوع من الإصابات، وهي الكدمات والسحجات والتهتّكات الصغيرة

مواقع التسمم بالغاز:

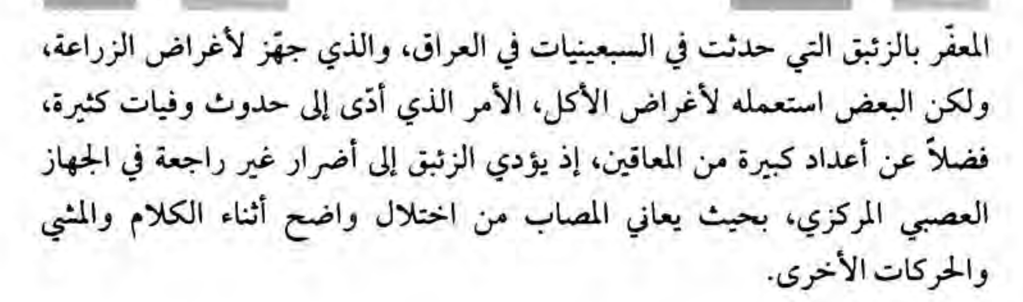
يحدث أن يتسمم الناس القريبين من مكائن الاحتراق الداخلي أو مدافئ أو طباخات النفط والغاز وعوادم السيارات، وخصوصاً داخل الأماكن القليلة التهوية كالجراجات والمطابخ المغلقة. فمثلاً ينطبق على ذلك غرف النوم التي تُترك فيها مدفآت نفطية مشتعلة حتى الصباح في العراق أو في مصر من جرّاء تسرّب الغاز من صنبور غاز مفتوح دون اشتعال.

يُعدّ غاز أول أوكسيد الكربون من أشهر الغازات المُسبّبة للموت، وذلك لألفته العالية للاتحاد مع الهيموجلوبين، مقارنةً بالأوكسجين، كما أن غازي الميثان وثاني أوكسيد الكربون تُعدّ أيضاً من الغازات الخطرة ، والتي تزداد نسبتها في الأماكن

العميقة مثل شبكات الصرف الصحي والآبار والمناجم، وفي هذه المناطق تنخفض نسبة الأوكسجين تدريجياً مع العمق لتصل إلى 2٪ بدلاً من 20٪ لتحلّ محلّها الغازات سالفة الذكر. وهنالك أمثلة كثيرة على أشخاص نزلوا إلى قاع خزان صرف صحي أو بئر، فلم يخرجوا منه. فقد حدث في إحدى المرات أن توفي ثلاثة عمّال مجاري في حي نادر في الحلة (بابل)، عندما حاول العاملان الثاني والثالث إنقاذ من سبقه من القاع. وقد يحدث أحياناً أن تؤدي هبّة الغاز المنضغطة المندفعة بسرعة باتجاه فتحة غطاء البالوعة للأعلى خنق الشخص الذي رفع الغطاء، وخصوصاً إذا كان ذلك الغطاء المعدني لا يحتوي على ثقوب تنفيس، لذلك من الضروري تجهيز شبكات المجاري الصحية في البيوت والمنشآت بأنبوب عمودي مفتوح باتجاه الأعلى. وأذكر وفاة أحد أقاربي (رحمه الله) في حي الكرامة (الحلة) عندما سكب السائل الذي يوضع في بطاريات السيارات (حامض قوي) في مجرى الحمام لغرض فتحه، وحينها انطلقت هبّة غازية قوية في وجهه وخنقته، إلى درجة أنك ترى ازرقاق جسمه من حزام البطن فأعلى.

التسمم بالمبيدات والمعادن الثقيلة:

يحدث التسمم في أحيان كثيرة بالمبيدات، وخصوصاً للأشخاص العاملين في هذا المجال والمتضررين بقصد أو بغير قصد، وتشكّل المبيدات الحشرية الفسفورية العضوية وسموم القوارض، مثل فوسفيد الزنك والبروديفاكوم المستعملة في المنازل والحدائق خطراً كبيراً في هذا المجال. وأذكر بعض الحوادث لتقريب الصورة، فمثلاً قامت امرأة بوضع القشطة في طبق فيه بقايا لسم فئران وتقديمه إلى أطفالها الثلاثة كوجبة إفطار شهية انتهت بموت الثلاثة. وفي ذات مرة قامت إحدى الأمهات بوضع مبيد الكلوريدين المشابه للون البيبسي كولا في عبوة شراب بيبسي كولا فارغة، عندها قام الطفل المتخلّف عقلياً بشربه، وهنا ثار جدل كبير حول تعمّد الأم في وضع المبيد في قنينة المشروب، أم أنه حدث سهواً، والله أعلم! وفي مدينة الحلة قامت إحدى الأمهات الذكيات، بعد أن لاحظت القمل يُعشعش في شعر رأس أطفالها الأربعة، بوضع كمية كبيرة من المبيد الحشري بف باف مساءً وتركه حتى الصباح، ولولا رحمة ربك وتدخّل الأطباء وعلاجهم بحقن الأتروبين، لانتهى الأمر بكارثة... وكلنا يتذكّر كارثة القمح



المعفّر بالزئبق التي حدثت في السبعينيات في العراق، والذي جهّز لأغراض الزراعة، ولكن البعض استعمله لأغراض الأكل، الأمر الذي أدّى إلى حدوث وفيات كثيرة، فضلاً عن أعداد كبيرة من المعاقين، إذ يؤدي الزئبق إلى أضرار غير راجعة في الجهاز العصبي المركزي، بحيث يعاني المصاب من اختلال واضح أثناء الكلام والمشي والحركات الأخرى.

السقوط من ارتفاع:

يتعرّض العديد من الأشخاص إلى السقوط من ارتفاعات عالية بدافع الانتحار، أو لأسباب غير مقصودة، أو هرباً من حريق حاصرهم، مما اضطرهم لإلقاء أنفسهم من علو. كما حصل وأن رمى عدد من الأشخاص بأنفسهم من ارتفاعات قاتلة فراراً من النار المتوهجة في برجي التجارة العالميين في 11 سبتمبر 2001، بعد أن تمّ تفجيرهما بوساطة طائرات نقل الركاب في منهاتن، أمريكا. ويكون الأطفال ومرضى الصرع أكثر من غيرهم عرضةً لتلك المخاطر، فكم من طفل كان العوق أو الموت نصيبه بسبب حمامة واقفة على أعلى المنزل. وكذلك العمال وخصوصاً أولئك الذين يعملون على تنفيذ وترميم البنايات العالية وفي عمل قوالب الخشب والخرسانات للعمارات. وفي أحيان أخرى يحدث السقوط من علو شاهق نتيجة اختلال التوازن أو انزلاق الأقدام أو عيب في البناية، ولا يغيب عن البال احتمال اصطدام الجسم لأكثر من مرة أثناء سقوطه باتجاه الأرض. هذا ويمكن أن يؤدي الشجار بين الأشخاص إلى أن يدفع أحد المتشاجرين خصمه باتجاه الشرفة أو النافذة ومنها إلى أسفل. ويعمل بعض المجرمين على إلقاء ضحيته قبل أو بعد قتلها مباشرةً من أعلى، بهدف التمويه، وأحياناً بعد أن يُرغم الضحية على كتابة اعتراف خطي بالانتحار. ولعلنا نتذكّر التشكيك والجدل الحاد الذي احتدم في وسائل الإعلام حول كيفية سقوط الفنانة سعاد حسني من شرفة شقة صديقتها ووفاتها في لندن عام 2002.

حوادث الغرق:

تحصد حوادث الغرق عدداً لا بأس به من الأرواح، وهي الأخرى قد تكون بقصد أو بغير قصد. فأغلب الغرقى الطبيعيين إما أن يموتوا بسبب جهلهم بقواعد

ومهارات السباحة أو بسبب وجود تيارات وأمواج المياه القوية المتولدة في العمق. ولعل ما يُطلق عليه بدوّارات المياه (السوارات) في عمق الماء، والتي تعمل على سحب الشخص باتجاه مركز الدوارة القوي، ومن ثمّ إلقائه في العمق، أحد تلك الأسباب، وقد لا ينجو منها حتى السبّاح الماهر. فضلاً عن ذلك، ما يحدث من تشنّج أو إجهاد في عضلات السبّاح، وخصوصاً عضلات الأرجل. يزداد ارتباك الشخص بعد أن يأخذه الماء باتجاه العمق، ممّا يُشكّل ضغطاً نفسياً أكثر خطورة عليه، ينعكس في حركات مُجهدة مرتبكة. ويظهر هذا الأمر جلياً على الأشخاص المنتحرين الذين لا يعرفون السباحة بعد أن يتندّموا في آخر لحظات الغرق. وهذا ما حدث بالفعل لأحد طلاب المدارس، والذي انتحر في مدينة الصويرة في العراق بعد أن هدّده أباه القاسي بعقاب صارم إذا رسب في المدرسة، إذ لوحظت آثار أصابع التشبّث بحافة الجرف الطينية الحادة للشط المُندفع بقوّة في محاولات يائسة لإنقاذ نفسه.

حوادث الطرق:

هنالك نوعين من حوادث الطرق، يشمل النوع الأول الحوادث التي تواجه الأشخاص من خلال صدمة يتعرّض لها المارّون أو الواقفون في الطرق والساحات. أما النوع الثاني فيتمثّل بالحوادث التي يتعرّضون لها وهم في داخل السيارة. ففي النوع الأول يتعرّض المصاب إلى صدمة مباشرة من السيارة في مستوى الحوض والركبتين، ثمّ يتحدّد مسار الأمور تبعاً لسرعة السيارة، فعند السرع البطيئة (أقل من 60 كم / ساعة) يُطرح العابر أرضاً، ويواجه كل عواقب الارتطام بالأرض من سحجات وكدمات إلى كسور بسيطة ومركّبة (أخطرها كسر في قاع الجمجمة)، ثمّ احتمال السحق بسيارة أخرى. أما عند السُرع العالية، فقد يطير الشخص في الهواء ليسقط على مقدمة السيارة مُهشّماً الزجاجة الأمامية. وقد ينتهي به الأمر إلى دخول السيارة (تُسمّى عملية غرف)، وغالباً ما يصطدم رأسه بجزء من المقدمة قبل دخوله.

أما ما يحدث داخل السيارة بعد اصطدامها من الأمام، فيشكّل مجموعة من الأحداث المُتسارعة والمتلاحقة، ففي البداية يندفع الركاب، كردّ فعل، بقوة إلى الأمام، كلٌّ بما يواجهه، السائق مع المقود، والركاب مع ما يقابلهم من المقاعد، بحيث

يتعرّضون لكسور في الأطراف وتمزّق في الأوعية الدموية الكبرى في العنق والصدر، بسبب حركة الرأس التي تحدث بشدّة إلى الأمام ثمّ إلى الخلف.

هذا وتُشير الإحصائيات إلى أن الراكب المجاور للسائق هو أكثر الركاب عرضة للهلاك، وحتى أكثر من السائق نفسه، لأنه يُفاجأ بالموقف، بينما يكون السائق أكثر حيطةً وحذراً، كما أن السائق يهرب لا إرادياً كردّ فعل انعكاسي باتجاه أبعد من هدف الاصطدام على حساب من يجلس بجانبه، فيكون الشخص المجاور للسائق هو الضحية، وهذا ما حصل بالفعل عندما هرب أحد السائقين من الاصطدام ببقرة في الطريق الزراعي، وانتهى ذلك باصطدام السارة من جهة الشخص المجاور، بشجرة ضخمة حاول السائق أن يتحاشاها أيضاً، ومات الشخص قبل وصوله للمستشفى. وقد يحدث بأن يُلقي السائق بنفسه خارجاً بعد أن يفتح الباب تاركاً السيارة تتدحرج إلى قدرها المحتوم، كما فعلت إحدى الأمهات عندما هربت وتركت أطفالها الثلاثة في السيارة التي اندفعت إلى هاوية النهر.

وقد تلعب طبيعة القوانين دوراً في زيادة معدّل الوفيات، ففي العراق وبلدان أخرى مثلاً يتحاشى بعض الناس حمل أو إنقاذ شخص مدهوس بسيارة ومُلقى على قارعة الطريق، لأنه قد يتم إيداع الشخص المُبلّغ أو المُنقذ في السجن إلى حين استكشاف الحقيقة، ويزداد لأمر سوءاً إذا مات المصاب قبل وصوله المستشفى. وفي حوادث أخرى يقوم صاحب السيارة بترك الضحية مضرّجة بدمائها ويهرب مخافةً من العواقب، ولعل أقبح ما في الأمر هنا قيام بعض السائقين بالإجهاز على الضحية بعد أن يدوس عليه مرةً أخرى، طالما أن بقاء المصاب في المستشفى يعني بقاء السائق في السجن، أو أن المصاب قد تعرّف على شخصية السائق الذي دهسه بقصد أو بغير قصد.

ولا يفوتنا هنا بأن نتذكّر حوادث احتراق السيارات بعد انفجار خزّان البنزين، أو بعد تصادم سيارتين مع بعضهما البعض، إذ يحدث تفريغ كهربائي بين المركبات المتصادمة بفعل فرق الجهد الكهربائي المتولّد في البدن المعدني للسيارات، مولّداً شرارة كهربائية حارقة، لذلك يفضّل وضع سلسلة معدنية متدلّية من السيارة بحيث تمس

الأرض لتفرّغ هذه الشحنات، وهذا ما يحدث بالفعل في ناقلات الوقود الصهريجية للبنزين والنفط.

حوادث القطارات:

تتنوّع حوادث القطارات، فقد يخرج عن مساره وينقلب على ألأرض أو في الماء، أثناء عبوره أحد الجسور، أو ينحرف عن خط سيره فيدخل في منطقة مأهولة، أو تنزل مقدمته في ترعة، كما فعلها قطار المناشي. وقد سخرت الصحف من صورته وكتبت تحتها نزل ليشرب. وقد يتصادم قطار مع آخر من الأمام أو الخلف، وخصوصاً عند نقاط التقاطع لخطأ في السيطرة على خطوط السكك، أو يتصادم مع سيارة أخرى، وهذا ما حدث بالفعل عندما شطر قطار حافلة نقل ركاب كبيرة متوجّهة من الحلة إلى بغداد، إلى نصفين. وفي كل الأحوال تتشابه الإصابات في داخله مع ما يحدث داخل أي سيارة، إلاّ أن نظام المقاعد المتقابلة في القار يُعطي فرصة أكبر لارتطام الركاب ببعضهم.

هذا وقد يُقدم شخص على الانتحار بالاستلقاء على السكة، لتُقسمه العجلات عند المكان الذي اختاره لنفسه. وكثيراً ما تحدث الإصابات والوفيات عند محاولة بعض الأشخاص الركوب أو النزول قفزاً من بوابات القطار أثناء مروره في القرى والأحياء وتخفيف سرعته (شكل 11 – 3).



شكل (11 – 3). بتر في الساقين عند مفصل الركبة بفعل عجلات القطار

وأخيراً، في القطارات التي تعمل بالكهرباء، تُضاف خطورة الصعق بتيار كهربائي يصل فرق جهده إلى 600 فولت.

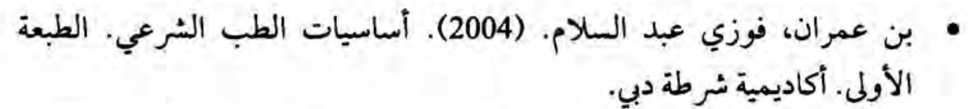
References المصادر

- Amos, B, and Pemberton, J. (1993). DNA fingerprinting in non-human population. Curr. Opin. Genet. Dev., 2: 857-860.
- Ayala, F.J. and Black, B. (1993). Science and the courts. Am. Sci. 18: 230-239.
- Belay, E.D. (1999). Thransmissible spongiform encephalopathies in humans. Annu. Rev. Microbial. 53: 283-314.
- Britten, R.J. and Kohne, D.E. (1970). Repeated segments of DNA. Sci. Amer., 222 (4): 24-31.
- Burden, D.W. and Whitney, D.B. (1995). Biotechnology: Proteins to PCR. Birkhause, Boston, USA.
- Caetano-Anolles, G., Bassam, B.J. and Gresshoff, P.M. (1991). DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. Bio. Technol., 9: 553-557.
- Cummins, H. and Midlo, C. (1976). Fingerprints, palms and soles. An introduction to dermatoglyphics. Mass Research Publishing, New Berlin.
- Curtis, H. and Barnes, N.S. (1989). Biology. 5th ed. Worth Publishers, INC. NY.
- Darnell, J., Harvey, L. and David, B. (1986). Molecular cell biology. Scientific American Books. NY.
- Dib, C., Faure, S., Fizmanes, C., Samson, D., Drouot, N., Vignal, A. and Millasseau, P. (1996). A comprehensive genetic map of human genome based on 5, 264 microsatellites. Nature, 380: 152-154.
- Epplen, J.T., McCarrey, J.R., Sutou, S. and Ohuo, S. (1982). Base sequence of cloned snake W chromosome DNA fragment and identification of a male specific putative mRNA in the mouse. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 79: 3798-3802.
- Gardner, E.J. and Snustad, D.P. (1981). Principles of genetics. 6th ed. John Wiley & Sons, NY.
- Gill, P., Ivanov, P.L., Kimpton, C., Piercy, R., Benson, N., Tully, G., Evett, I., Hagelberg, E. and Sullivan, K. (1994). Identification of the remains of the Romanov family by DNA analysis, Nature Genetics, 6: 130-135.
- Guyer, M.S. and Collins, F.S. (1995). How is the human genome project doing and what have we learned so far? Proc. Natl. Acad. Sci., USA. 92: 10841-10848.
- Hammond, H.A., Redman, J.B. and Caskey, C.T. (1995). In uteropaternity testing following alleged sexual assault. JAMA., 273: 1774-1777.
- Hoelzel, A.R. and Amoss, W. (1988). DNA fingerprinting and scientific whaling. Nature, 333: 305.
- Holt, S.B. (1968). The genetics of dermal ridges. Charles C. Thomas Publisher,

USA.

- Housman, D. (1995). Human DNA polymorphism. N. Eng. J. Med., 332: 318-320.
- Jeffreys, A.J., Brookfield, J.F. and Semwonoff, R. (1985). Positive identification of an immigration test case using human DNA fingerprints. Nature, 317: 818-819.
- Jeffreys, A.J., Wilson, V. and Thein, S.L. (1985). Hypervariable minisatellite regions in human DNA. Nature, 314: 67-73.
- Jones, K.W. and Singh, L. (1982). Conserved sex-associated repeated DNA sequences in vertebrates. In: Genome evolution. (Eds. Dove, G.A. and Flavell, R.B.). Academic Press. NY. PP. 135-154.
- Jorde, L. B., Carey, J.C., Bamshad, M.J. and White, R.L. (1999). Medical genetic. 2nd ed. Mosby, Inc. USA.
- Joshi, C.P. and Nguyen, H.T. (1993). Application of random amplified polymorphic DNA technique for detection of polymorphism among wild and cultivated tetraploid wheat. Genome, 36: 602-609.
- Klug, W.S. and Cummings, M.R. (1999). Essential of genetics. 3rd ed. Prentice Hall. USA.
- Klug, W.S. and Cummings, M.R. (2003). Concepts of genetics. 7th ed. Prentice Hall, USA.
- Knight, B. (1997). Simpson's forensic medicine. 11th ed., Arnold Group. London.
- Koshland, D.E. (1994). The DNA fingerprint story. Science, 275: 1015.
- Krawczak, M. and Schmadtke, J. (1994). DNA fingerprinting. Oxford: BIOS Scientific.
- Krontiris, T.G. (1995). Minisatellites and human disease. Science, 269: 1682-1683.
- Lewin, B. (1983). Genes. John Wiley & Sons, NY.
- Lewontin, R. and Hartl, D. (1991). Population genetics in forensic DNA typing. Science, 254: 1745-1750.
- Llody, M.A. and Fields, M.J. (1989). Bkm minisatellite sequences are not sex associated but reveal DNA fingerprint polymorphisms in rainbow trout. Genome, 32: 865-868.
- Mader, S.S. (2002). Human biology, 7th ed. McGraw-Hill. NY.
- Marx, L. (1988). DNA fingerprinting takes the witness stand. Science, 240: 1616-1618.
- McEwen, J.E. and Reilly, P.R. (1994). A review of state legislation on DNA forensic databanking. American Journal of Human Genetics, 54: 941-958.
- Mullis, K.B., Ferre, F. and Gibbs, R.A. (1994). PCR-the polymerase chain reaction. Birkhauser Verlag, AG.

- Norris, R. (1994). Forensic DNA goes to court with O.J. Science, 265: 1352-1354.
- Old, R.W. and Primrose, S.B. (1985). Principles of gene manipulation: An introduction to genetic engineering. Blackwell Scientific Publication.
- Pai, C.Y., Chou, S.L., Yang, C.H. and Tang, T.K. (1995). Flow chart HLA-DQA1genotyping and its application to a forensic case. Journal of Forensic Sciences, 40: 228-235.
- Rychlik, W., Spencer, W.J. and Rhoads, R.E. (1990). Optimization of the annealing temperature for DNA amplification *in vitro*. Nucleic Acids Research, 18: 6409-6412.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J. Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. and Erlich, H.A. (1988). Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. The first description of PCR with Taq polymerase. Science, 239: 487-491.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T. (1989). Molecular cloning. A laboratory manual. Cold Spring Laboratory. Cold Spring Harbor, NY.
- Shimada, T., Hayama, H., Haji, T., Yamaguchi, M. and Yoshida, M. (1999). Genetic diversity of plums characterized by random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. Euphytica, 109: 143-147.
- Singh, L., Purdom, I.F. and Jones, K.W. (1980). Sex chromosome associated satellite DNA: Evolution and conservation. Chromosome, 79: 137-157.
- Snustad, D.P., Simmons, M.J. and Jenkins, J.B. (1997). Principles of genetics. John Wiley & Sons, INC. NY.
- Southern, E.M. (1975). Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., 98: 503-517.
- Stryer, L. (1988). Biochemistry. 3rd ed. W.H. Freeman and Company. NY.
- VanOarschot, R.A.H., Gutowski, S.J. and Robinson, S.L. (1994). HuMTHO1: amplification, species specificity, population genetics and forensic applications. International Journal of Legal-Medicine, 107: 121-126.
- Watson, J.D., John, T. and David, T.K. (1983). Recombinant DNA: A short course. W.H. Freeman and Company. NY.
- Welsh, J. and McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primes. Nucl. Acids Res., 18: 7213-7218.
- Willams, J.G., Kubelik, A.R., Livak, K.J., Rafalski, J.A. and Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. Nucl. Acids Res., 18: 6531-6535.



- بن عمران، فوزي عبد السلام. (2004). أساسيات الطب الشرعي. الطبعة الأولى. أكاديمية شرطة دبي.
- حمّاد، السباعي. (2004). الطبيب وكشف الجريمة. الطبعة الأولى، دار الكتب المصرية.
- نيكول، ديزموند. (2002). مقدمة في الهندسة الوراثية. ترجمة د. عبد القادر عبد الرواف المالح. الطبعة الأولى، الهيئة القومية للبحث العلمي. طرابلس. ليبيا.
- السعدي، علي حمود (2009). الغذاء المُهندس وراثياً. الطبعة الأولى، دار الصادق، بابل – العراق.
- هاريس، مورين، أ. و ري، أيان، ف. (2009). الطرق العامة لزراعة الخلية. ترجمة د. علي حمود السعدي و د. عبد السلام موسى بو الحاج ، الطبعة الأولى ، دار الصادق، بابل – العراق.